



**HAL**  
open science

# Autopsie analytique des perturbations lipidiques de cellules placentaires exposées aux phtalates

Julia Petit

► **To cite this version:**

Julia Petit. Autopsie analytique des perturbations lipidiques de cellules placentaires exposées aux phtalates. Chimie analytique. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB126 . tel-04277121

**HAL Id: tel-04277121**

**<https://theses.hal.science/tel-04277121>**

Submitted on 9 Nov 2023

**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.

**Université Paris Descartes**

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
École doctorale Médicament Toxicologie Chimie Imagerie

**THÈSE**

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
**Docteur de l'université Paris Descartes**  
**Spécialité : Chimie analytique**

Par

**Julia Petit**

le 1<sup>er</sup> février 2017

**AUTOPSIE ANALYTIQUE DES PERTURBATIONS LIPIDIQUES DE  
CELLULES PLACENTAIRES EXPOSÉES AUX PHTALATES**

Membres du jury :

Pr Valérie PICHON

Rapporteur

Dr Christophe JUNOT

Rapporteur

Dr Thierry FOURNIER

Examineur

Pr Pierre CHAMINADE

Examineur

Dr Nicolas AUZEIL

Examineur

Pr Olivier LAPRÉVOTE

Directeur de thèse



## PLAN DE LA THESE

<b>Préambule</b> .....	23
<b>Introduction</b> .....	27
I. Le placenta humain .....	28
II. Les phtalates.....	54
III. Etude lipidomique.....	66
<b>Culture cellulaire</b> .....	125
I. Cellules JEG-3 .....	126
II. Culture primaire de trophoblastes.....	127
III. Protocole de l'étude.....	128
<b>Dosage du MEHP</b> .....	131
I. Introduction .....	132
II. Matériel et méthodes.....	132
III. Résultats .....	137
IV. Discussion.....	148
V. Conclusion .....	149
<b>Analyse lipidomique globale dans les cellules JEG-3</b> .....	151
I. Introduction .....	152
II. Matériel et méthodes.....	152
III. Résultats .....	156
IV. Discussion.....	166
V. Conclusion .....	171
<b>Analyse des eicosanoïdes dans les cellules JEG-3</b> .....	173
I. Introduction .....	174
II. Matériel et méthodes.....	174
III. Résultats .....	182
IV. Discussion.....	204
V. Conclusion .....	206
<b>Dosage des oxystérols dans les cellules JEG-3</b> .....	207
I. Introduction .....	208
II. Matériel et méthodes.....	208
III. Résultats .....	212
IV. Discussion.....	214
V. Conclusion .....	216
<b>Analyse transcriptomique</b> .....	217
I. Introduction .....	218
II. Matériel et méthodes.....	218
III. Résultats .....	219
IV. Discussion.....	220
V. Conclusion .....	222
<b>Analyse lipidomique globale sur des cultures primaires de trophoblastes</b> .....	227
I. Introduction .....	228
II. Matériel et méthodes.....	228
III. Résultats .....	230
IV. Discussion.....	243
V. Conclusion .....	247
<b>Conclusion générale</b> .....	249
<b>Annexes</b> .....	255
<b>Références bibliographiques</b> .....	265
<b>Valorisations scientifiques</b> .....	303



## TABLE DES MATIERES

<b>Préambule</b> .....	23
<b>Introduction</b> .....	27
I. Le placenta humain .....	28
A. Le développement placentaire .....	28
1. Les étapes de développement du placenta .....	29
2. Le cytotrophoblaste .....	30
B. Les fonctions placentaires .....	31
1. Fonctions d'échanges .....	31
2. Fonctions de filtres .....	33
3. Fonctions endocrines .....	33
C. Les modèles d'étude du placenta humain .....	34
1. Les cultures d'explants .....	34
2. Les cultures primaires .....	34
3. Les lignées cellulaires .....	35
3.1. Les choriocarcinomes .....	35
3.2. Les lignées non tumorales .....	35
D. Anomalies pathologiques du placenta .....	36
1. Anomalies génétiques et/ou chromosomiques : exemple de la prééclampsie.....	36
1.1. Épidémiologie de la prééclampsie .....	37
1.2. Signes cliniques et biologiques .....	37
1.3. Physiopathologie de la prééclampsie .....	38
1.4. Biomarqueurs associés à la prééclampsie .....	39
2. Facteurs environnementaux .....	40
2.1. Infections bactériennes et virales .....	40
2.2. Perturbateurs endocriniens .....	40
2.2.1. Définition et origine.....	41
2.2.2. Identification et classification .....	42
2.2.3. Fenêtre d'exposition et conséquences cliniques .....	43
2.2.4. Mécanismes d'action .....	43
E. Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .....	44
1. La famille des PPARs et leurs ligands .....	44
1.1. Les différentes isoformes PPARs .....	44
1.2. Les ligands de PPAR $\gamma$ .....	45
1.2.1. Les ligands naturels .....	45
1.2.2. Les ligands synthétiques .....	45
1.2.3. Les ligands non naturels .....	46
1.3. Le mécanisme d'action de PPAR $\gamma$ .....	47

2.	PPAR $\gamma$ et le placenta humain .....	49
2.1.	Rôle de PPAR $\gamma$ dans le placenta humain .....	50
2.2.	Rôle de PPAR $\gamma$ dans le métabolisme lipidique placentaire .....	50
2.2.1.	Les ligands potentiels de PPAR $\gamma$ dans le placenta humain .....	50
2.2.2.	Les gènes cibles de PPAR $\gamma$ dans le placenta humain .....	53
II.	Les phtalates.....	54
A.	Le DEHP.....	55
1.	Définition et utilisations.....	55
2.	Voies d'expositions.....	56
2.1.	La voie orale.....	56
2.2.	La voie percutanée.....	56
2.3.	La voie respiratoire.....	56
2.4.	La voie intraveineuse .....	57
3.	Métabolisme.....	57
4.	Effets connus .....	59
4.1.	Effets chez le rat .....	59
4.2.	Effets chez l'Homme .....	59
5.	Classification et réglementation.....	60
B.	Le MEHP .....	62
1.	Propriétés chimiques.....	62
2.	Effets connus .....	64
2.1.	Effets chez la souris .....	64
2.2.	Effets chez l'Homme .....	64
2.3.	Effets sur le lipidome .....	64
III.	Etude lipidomique.....	66
A.	Les lipides.....	66
1.	Les acides gras .....	68
1.1.	Les acides gras libres.....	68
1.2.	Les eicosanoïdes .....	70
2.	Les glycérolipides.....	71
2.1.	Les monoacylglycérols .....	72
2.2.	Les diacylglycérols .....	72
2.3.	Les triacylglycérols .....	73
3.	Les glycérophospholipides .....	73
3.1.	Les acides phosphatidiques .....	73
3.2.	Les phosphatidylcholines .....	74
3.3.	Les phosphatidyléthanolamines .....	75
3.4.	Les phosphatidylsérines.....	76

3.5.	Les phosphatidylglycérols .....	76
3.6.	Les phosphatidylinositols .....	77
4.	Les sphingolipides.....	78
4.1.	Les céramides.....	79
4.2.	Les sphingomyélines.....	79
5.	Les stérols.....	80
5.1.	Le cholestérol.....	80
5.2.	Les oxystérols .....	81
B.	L'analyse lipidomique.....	83
1.	La préparation d'échantillons.....	84
1.1.	L'extraction liquide-liquide .....	84
1.1.1.	Principe général .....	84
1.1.2.	Application aux lipides.....	86
1.2.	L'extraction sur phase solide .....	88
1.2.1.	Principe général .....	88
1.2.2.	Application aux lipides.....	90
2.	La séparation chromatographique .....	91
2.1.	La chromatographie liquide à polarité de phase normale .....	93
2.1.1.	Principe général .....	93
2.1.2.	Application à la lipidomique .....	93
2.2.	La chromatographie liquide à polarité de phase inversée.....	94
2.2.1.	Principe général .....	94
2.2.2.	Application à la lipidomique .....	95
2.3.	Paramètres importants en chromatographie et avancées technologiques .....	96
3.	Le système de détection par spectrométrie de masse .....	97
3.1.	Les sources d'ionisation .....	97
3.1.1.	L'électronébulisation .....	98
3.1.2.	La photoionisation à pression atmosphérique .....	99
3.2.	Les analyseurs.....	101
3.2.1.	Le quadripôle .....	102
3.2.2.	L'analyseur à temps de vol.....	103
3.2.3.	L'hybride quadripôle-temps de vol.....	104
4.	L'approche lipidomique.....	105
4.1.	Analyse globale, semi-globale et ciblée.....	105
4.2.	Design expérimental.....	107
4.2.1.	Les contrôles.....	107
4.2.2.	L'ordre d'injection .....	108

4.3.	L'obtention de la matrice de données .....	108
4.3.1.	Le prétraitement des données.....	108
4.3.2.	La normalisation des données.....	111
4.3.2.1.	La normalisation inter-échantillons.....	111
4.3.2.2.	La normalisation intra-échantillon .....	112
4.3.3.	La filtration des données .....	113
4.4.	Les analyses statistiques multivariées.....	113
4.4.1.	Les analyses non supervisées .....	114
4.4.1.1.	Principe .....	114
4.4.1.2.	Évaluation des performances .....	115
4.4.2.	Les analyses supervisées .....	116
4.4.2.1.	L'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels..	116
4.4.2.1.1.	Principe .....	116
4.4.2.1.2.	Évaluation des performances .....	116
4.4.2.2.	L'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels orthogonale.....	118
4.4.2.2.1.	Principe .....	118
4.4.2.2.2.	Évaluation des performances .....	119
4.4.2.3.	L'analyse par machine à vecteurs de support.....	119
4.4.2.3.1.	Principe .....	119
4.4.2.3.2.	Évaluation des performances .....	120
4.5.	Analyses statistiques univariées.....	121
4.6.	L'identification des lipides.....	122
<b>Culture cellulaire</b>	.....	125
I.	Cellules JEG-3 .....	126
1.	Étude préliminaire.....	126
2.	Mise en culture et incubation des cellules .....	127
II.	Culture primaire de trophoblastes.....	127
III.	Protocole de l'étude.....	128
<b>Dosage du MEHP</b>	.....	131
I.	Introduction .....	132
II.	Matériel et méthodes.....	132
A.	Mise au point de la méthode de dosage du MEHP .....	132
1.	Ajustement des paramètres d'UPLC-MS .....	132
2.	Extraction sur phase solide .....	133
3.	Effet matrice .....	136
4.	Validation de la méthode .....	136
B.	Dosage du MEHP dans diverses matrices biologiques .....	136
1.	Dosage dans les milieux de culture et les culots cellulaires.....	136

2.	Dosage dans les villosités placentaires .....	137
III.	Résultats .....	137
A.	Mise au point de la méthode de dosage .....	137
1.	Ajustement des paramètres d'UPLC-MS .....	137
2.	Extraction sur phase solide .....	139
3.	Effet matrice .....	144
4.	Validation de la méthode de dosage.....	146
B.	Dosage du MEHP dans diverses matrices biologiques .....	146
1.	Dosage du MEHP dans les milieux de culture et les culots cellulaires.....	147
2.	Dosage dans les villosités placentaires .....	148
IV.	Discussion.....	148
V.	Conclusion .....	149
	<b>Analyse lipidomique globale dans les cellules JEG-3</b> .....	151
I.	Introduction .....	152
II.	Matériel et méthodes.....	152
A.	Préparation des échantillons.....	152
B.	Analyse UPLC-MS.....	153
C.	Design expérimental.....	154
D.	Prétraitement des données .....	154
E.	Analyses statistiques multivariées.....	155
F.	Annotation des variables.....	155
G.	Courbe ROC .....	155
III.	Résultats .....	156
A.	Analyse UPLC-MS.....	156
B.	Prétraitement des données .....	158
C.	Analyses statistiques multivariées .....	159
D.	Annotation des variables .....	163
E.	Courbe ROC.....	165
IV.	Discussion.....	166
V.	Conclusion .....	171
	<b>Analyse des eicosanoïdes dans les cellules JEG-3</b> .....	173
I.	Introduction .....	174
II.	Matériel et méthodes.....	174
A.	Mise au point de la méthode d'analyse .....	174
1.	Analyse par UPLC-MS .....	175
1.1.	Ajustement des paramètres de chromatographie .....	175
1.2.	Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse .....	176
2.	Extraction sur phase solide .....	178
3.	Effet matrice .....	179
4.	Validation de la méthode .....	180

B.	Analyse des eicosanoïdes sur les culots cellulaires JEG-3 .....	180
1.	Traitement des échantillons .....	180
2.	Analyse UPLC-MS .....	181
3.	Prétraitement des données .....	181
4.	Analyses statistiques multivariées .....	181
5.	Annotation des variables .....	181
III.	Résultats .....	182
A.	Mise au point de la méthode d'analyse .....	182
1.	Analyse UPLC-MS .....	182
1.1.	Ajustement des paramètres chromatographiques .....	182
1.2.	Optimisation des paramètres MS .....	189
2.	Extraction sur phase solide .....	193
3.	Effet matrice .....	195
4.	Validation de la méthode .....	196
B.	Analyse des eicosanoïdes dans les culots cellulaires JEG-3 .....	198
1.	Prétraitement des données .....	198
2.	Analyses statistiques multivariées .....	199
3.	Annotation des variables .....	201
IV.	Discussion .....	204
V.	Conclusion .....	206
	<b>Dosage des oxystérols dans les cellules JEG-3</b> .....	207
I.	Introduction .....	208
II.	Matériel et méthodes .....	208
A.	Préparation des échantillons .....	208
B.	Analyse UPLC-MS .....	209
C.	Traitement des données .....	211
III.	Résultats .....	212
A.	Analyse UPLC-MS .....	212
B.	Traitement des données .....	212
IV.	Discussion .....	214
V.	Conclusion .....	216
	<b>Analyse transcriptomique</b> .....	217
I.	Introduction .....	218
II.	Matériel et méthodes .....	218
III.	Résultats .....	219
IV.	Discussion .....	220
V.	Conclusion .....	222
	<b>Analyse lipidomique globale sur des cultures primaires de trophoblastes</b> .....	227
I.	Introduction .....	228
II.	Matériel et méthodes .....	228
A.	Préparation des échantillons .....	228
B.	Analyse UPLC-MS .....	228

C.	Design expérimental.....	229
D.	Prétraitement des données .....	229
E.	Analyses statistiques multivariées.....	229
F.	Annotation des variables.....	229
G.	Courbe ROC .....	230
III.	Résultats.....	230
A.	Prétraitement des données .....	230
B.	Analyses statistiques multivariées des trois groupes d'échantillons .....	232
1.	MEHP à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ vs DMSO .....	234
1.1.	Analyses supervisées.....	234
1.2.	Annotation des variables .....	237
1.3.	Courbe ROC .....	238
2.	MEHP à 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ vs DMSO .....	239
2.1.	Analyses supervisées.....	239
2.2.	Annotation des variables .....	242
2.3.	Courbe ROC .....	243
IV.	Discussion.....	243
A.	Comparaison entre les deux doses d'incubation .....	243
B.	Comparaison entre la culture primaire et la lignée cellulaire .....	246
V.	Conclusion .....	247
	<b>Conclusion générale</b> .....	249
	<b>Annexes</b> .....	255
	<b>Références bibliographiques</b> .....	265
	<b>Valorisations scientifiques</b> .....	303



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Le placenta humain (d'après <sup>2</sup> ) .....	28
Figure 2 : Représentation schématique des principales étapes du développement placentaire humain (d'après <sup>3</sup> ) .....	30
Figure 3 : La villosité chorale ancrée, unité structurale et fonctionnelle du placenta (d'après <sup>7</sup> ).....	31
Figure 4 : Principales voies de transfert du syncytiotrophoblaste (d'après <sup>10</sup> ) .....	32
Figure 5 : Schéma simplifié de la physiopathologie de la prééclampsie (d'après <sup>57</sup> ) .....	39
Figure 6 : Régulation de la transcription par l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR (d'après <sup>114</sup> ).....	49
Figure 7 : Transfert des acides gras dans le placenta humain (d'après <sup>10</sup> ).....	52
Figure 8 : Régulation du métabolisme lipidique via l'activation de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR par leurs ligands respectifs (d'après <sup>130,131</sup> ) .....	53
Figure 9 : Structure de l'acide phtalique.....	54
Figure 10 : Métabolisation du DEHP (d'après <sup>151</sup> ) .....	58
Figure 11 : Diagramme de prédominance des espèces du MEHP en fonction du pH .....	63
Figure 12 : Mécanisme d'action hypothétique du MEHP et de son implication dans le métabolisme lipidique placentaire.....	66
Figure 13 : « Briques élémentaires » caractéristiques des lipides.....	67
Figure 14 : Différentes voies de synthèse des eicosanoïdes .....	70
Figure 15 : Schéma simplifié du métabolisme des glycérolipides .....	73
Figure 16 : Structure globale des glycérophosphates .....	74
Figure 17 : Structure des phosphatidylsérines .....	76
Figure 18 : Structure des phosphatidylglycérols .....	77
Figure 19 : Structure du L-myo-inositol.....	77
Figure 20 : Structures des bases sphingoïdes majoritaires.....	78
Figure 21 : Structures des céramides et dihydrocéramides .....	79
Figure 22 : Structure des sphingomyélines.....	80
Figure 23 : Structure du squelette commun aux stérols .....	80
Figure 24 : Structure du cholestérol.....	81
Figure 25 : Métabolisme du cholestérol .....	82
Figure 26 : Structure du 7-céto-cholestérol et du 7 $\beta$ -hydroxycholestérol .....	82
Figure 27 : Étapes de l'extraction liquide-liquide.....	85
Figure 28 : Étapes de l'extraction sur phase solide.....	88
Figure 29 : Force éluante des principaux solvants de SPE .....	90
Figure 30 : Schéma d'une séparation chromatographique.....	92

Figure 31 : Séparation de glycérophospholipides standards en chromatographie de partage normal, sur phase stationnaire de silice vierge (d'après <sup>247</sup> ).....	94
Figure 32 : Séparation de phosphatidyléthanolamines avec un nombre d'insaturations différent en chromatographie de partage inverse, sur une phase stationnaire de silice greffée C <sub>18</sub> (d'après <sup>247</sup> ) .....	95
Figure 33 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse .....	97
Figure 34 : Principe de l'électronébulisation en mode positif (d'après <sup>256</sup> ) .....	98
Figure 35 : Principe de la photoionisation à pression atmosphérique (d'après <sup>258</sup> ).....	99
Figure 36 : Principe d'un analyseur quadripolaire (d'après <sup>268</sup> ) .....	103
Figure 37 : Principe d'un analyseur à temps de vol équipé d'un réflectron (d'après <sup>273</sup> ) .....	104
Figure 38 : Principe d'un analyseur hybride Q-TOF .....	105
Figure 39 : Étapes du prétraitement des données LC-MS à l'aide du logiciel XCMS .....	109
Figure 40 : Principe de la détection des régions d'intérêt (d'après <sup>294</sup> ) .....	110
Figure 41 : Matrice de données constituée de l'ensemble des variables intégrées et de leurs intensités dans chaque échantillon .....	111
Figure 42 : Décomposition de la matrice de données X lors d'une analyse en composantes principales .....	114
Figure 43 : Principe de construction et de représentation d'une analyse en composantes principale .....	115
Figure 44 : Représentation graphique d'un test de permutation.....	117
Figure 45 : Illustration géométrique du changement de référentiel entre la PLS-DA et l'OPLS-DA (d'après <sup>316</sup> ) .....	118
Figure 46 : Représentation S-plot d'un modèle généré en OPLS-DA (d'après <sup>317</sup> ).....	119
Figure 47 : Représentation de classification par SVM (d'après <sup>318</sup> ).....	120
Figure 48 : Représentation graphique d'une courbe ROC selon différentes valeurs d'AUC	121
Figure 49 : Viabilité cellulaire de la lignée cellulaire JEG-3 après incubation avec le MEHP (d'après <sup>331</sup> ) .....	126
Figure 50 : Protocole de l'étude menée sur la lignée cellulaire JEG-3 et sur la culture primaire de cytotrophoblastes vilieux.....	129
Figure 51 : Gradient chromatographique pour l'analyse du MEHP par UPLC-MS .....	133
Figure 52 : Temps de rétention du MEHP et du MEHP* selon le gradient défini .....	133
Figure 53 : Structures des différents supports de rétention testés pour l'extraction du MEHP par SPE.....	134
Figure 54 : Protocoles de SPE testés selon le type de supports Oasis® HLB, WAX ou MAX .....	135

Figure 55 : Rendements d'extraction du MEHP à deux concentrations différentes dans l'eau, sur cartouches Oasis® HLB, avec et sans ajout d'acide formique à la solution de percolation (n = 1).....	140
Figure 56 : Rendements d'extraction du MEHP à deux concentrations différentes dans l'eau, sur cartouches Oasis® WAX, avec et sans ajout d'acide formique à la solution de percolation (n = 1).....	141
Figure 57 : Rendements d'extraction du MEHP à deux concentrations différentes dans l'eau, sur cartouches Oasis® MAX, avec et sans ajout d'acide formique à la solution de percolation (n = 1).....	142
Figure 58 : Rendements d'extraction du MEHP (n = 3) selon les solvants utilisés pour la seconde étape de lavage, sur cartouches Oasis® WAX, à 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , en présence d'AF à 2 % lors de la percolation .....	144
Figure 59 : Effet matrice entre l'eau, le milieu de culture pur et le milieu de culture dilué au dixième, pour l'analyse du MEHP entre 10 et 100 $\text{nmol.L}^{-1}$ (n = 1) .....	145
Figure 60 : Effet matrice entre l'eau et les culots cellulaires repris et broyés dans l'eau, à trois concentrations différentes : 100, 200 et 250 $\text{nmol.L}^{-1}$ (n = 1) .....	145
Figure 61 : Répétabilité de la méthode de dosage du MEHP, dans l'eau, pour une gamme allant de 0,01 à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (n = 3).....	146
Figure 62 : Gradient chromatographique utilisé pour l'analyse lipidomique globale par UPLC-ESI-MS.....	153
Figure 63 : Séparation chromatographique du mélange de lipides standards.....	157
Figure 64 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection, en ESI+.....	158
Figure 65 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection, en ESI- .....	159
Figure 66 : Score plots des modèles construits en PCA en ESI+ et ESI-.....	160
Figure 67 : Score plots des modèles générés en PLS-DA, en ESI+ et ESI-.....	161
Figure 68 : Représentation des tests de permutation effectués en ESI+ et ESI- sur les modèles construits par PLS-DA.....	161
Figure 69 : Score plots des modèles construits par OPLS-DA, en ESI+ et ESI- .....	162
Figure 70 : S-plots des modèles créés en OPLS-DA, en ESI+ et ESI-.....	163
Figure 71 : Relation entre le temps de rétention $t_R$ et l'ECN pour trois sous-classes de glycérophospholipides contenus dans le mélange de lipides standards .....	164
Figure 72 : Trois exemples de représentation de l'algorithme généré par SVM sous forme de courbes ROC .....	165
Figure 73 : Boxplots des valeurs d'AUC moyennes et médianes par classe de lipides annotés .....	166

Figure 74 : Schéma non exhaustif du métabolisme des glycérolipides et des glycérophospholipides .....	169
Figure 75 : Schéma non exhaustif du métabolisme des sphingolipides .....	171
Figure 76 : Différentes conditions testées pour la percolation et le lavage du mélange standard d'eicosanoïdes sur le support Oasis® HLB .....	179
Figure 77 : Gradient chromatographique pour l'analyse initiale du mélange d'eicosanoïdes standards par UPLC-MS .....	183
Figure 78 : Chromatogramme obtenu dans les conditions initiales décrites .....	183
Figure 79 : Résolution (A) et intensité (B) en fonction du débit de phase mobile à température de colonne constante .....	184
Figure 80 : Résolution (A) et intensité (B) en fonction de la température de colonne, à débit de phase mobile constant.....	185
Figure 81 : Séparation d'un mélange des sous-classes HETEs et EETs selon quatre plateaux d'élution différents.....	186
Figure 82 : Gradient chromatographique final pour l'analyse du mélange d'eicosanoïdes final .....	187
Figure 83 : Séparation chromatographique du mélange d'eicosanoïdes standards dans les conditions finales.....	188
Figure 84 : Valeurs observées en fonction des valeurs prédictives.....	191
Figure 85 : Rendements à l'élution selon différentes conditions de percolation et de lavage (n = 1).....	193
Figure 86 : Rendements à l'élution selon l'absence ou la présence d'acide formique à la solution de percolation (n = 3) .....	194
Figure 87 : Évaluation de l'effet matrice pour six eicosanoïdes, sur trois concentrations différentes : 15, 60 et 100 nmol.L <sup>-1</sup> .....	196
Figure 88 : Répétabilité de la méthode d'analyse des eicosanoïdes dans un mélange H <sub>2</sub> O/MeOH 50/50 (v/v), pour une gamme de 20 à 200 nmol.L <sup>-1</sup> .....	197
Figure 89 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection .....	199
Figure 90 : Score plot du modèle généré en PCA.....	200
Figure 91 : Score plot et test de permutation (999 itérations) du modèle construit en PLS-DA .....	200
Figure 92 : Score-plot et S-plot du modèle généré en OPLS-DA .....	201
Figure 93 : Relation entre le temps de rétention t <sub>R</sub> et le logP pour un mélange d'acides gras libres standards .....	202
Figure 94 : Boxplot du dosage de l'acide arachidonique dans les culots cellulaires incubés en présence de MEHP (MEHP) et les culots cellulaires contrôles (DMSO) .....	203

Figure 95 : Schéma de la réaction de dérivation entre le DMAPI et le cholestérol .....	209
Figure 96 : Gradient chromatographique utilisé pour l'analyse des oxystérols par UPLC-ESI-MS.....	210
Figure 97 : Gradient chromatographique utilisé pour l'analyse du cholestérol et du 7-kéto par UPLC-APPI-MS.....	211
Figure 98 : Séparation chromatographique du mélange standard d'oxystérols dans les conditions mises au point <sup>248</sup> .....	212
Figure 99 : Gammes d'étalonnage pour le dosage des oxystérols.....	213
Figure 100 : Sites de coupure des phospholipases sur la classe des glycérophospholipides .....	221
Figure 101 : Schéma récapitulatif des gènes dont l'expression est modifiée par la présence de MEHP et leur lien potentiel avec les perturbations du lipidome observées lors de l'analyse lipidomique .....	222
Figure 102 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection, en ESI+ .....	231
Figure 103 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection, en ESI-.....	232
Figure 104 : Score plots des modèles ternaires construits en PCA, en ESI+ et ESI- .....	233
Figure 105 : Score plots des modèles ternaires générés en PLS-DA, en ESI+ et ESI- .....	234
Figure 106 : Score plots des modèles binaires générés en PLS-DA, en ESI+ et ESI- .....	235
Figure 107 : Représentation des tests de permutation effectués en ESI+ et ESI- sur les modèles binaires créés par PLS-DA.....	235
Figure 108 : Score plots des modèles binaires construits par OPLS-DA, en ESI+ et ESI- ..	236
Figure 109 : S-plots des modèles binaires construits en OPLS-DA, en ESI+ et ESI- .....	237
Figure 110 : Score plots des modèles binaires générés en PLS-DA, en ESI+ et ESI- .....	239
Figure 111 : Représentation des tests de permutation effectués en ESI+ et ESI- sur les modèles binaires construits par PLS-DA .....	240
Figure 112 : Score plots des modèles binaires construits en OPLS-DA, en ESI+ et ESI- ...	240
Figure 113 : S-plots des modèles binaires générés en OPLS-DA, en ESI+ et ESI- .....	241
Figure 114 : Boxplots des valeurs d'AUC moyennes et médianes par classe de lipides annotés .....	243
Figure 115 : Diagramme de Venn montrant la répartition des lipides discriminants entre les deux groupes d'échantillons incubés en présence de MEHP.....	244
Tableau 1 : Principales sources de perturbateurs endocriniens (d'après <sup>82</sup> ) .....	42
Tableau 2 : Les différents ligands de PPAR $\gamma$ .....	47
Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques du DEHP (d'après <sup>136</sup> ).....	55

Tableau 4 : Classifications réglementaires du DEHP (d'après <sup>134</sup> ) .....	61
Tableau 5 : Propriétés physico-chimiques du MEHP .....	63
Tableau 6 : Exemple de structures des huit classes de lipides établies par le LIPID MAPS Consortium.....	68
Tableau 7 : Principaux acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés.....	69
Tableau 8 : Structure du glycérol et exemple de glycérolipides .....	72
Tableau 9 : Structures des phosphatidylcholines.....	75
Tableau 10 : Structures des phosphatidyléthanolamines.....	76
Tableau 11 : Structure des phosphatidylinositols et des dérivés mono-, bis- et triphosphates .....	78
Tableau 12 : Classification réglementaire du chloroforme .....	87
Tableau 13 : Classification réglementaire du MTBE .....	87
Tableau 14 : Performances (indicatives) des différents analyseurs de masse (d'après <sup>268</sup> ) .	102
Tableau 15 : Intensité du pic MEHP en fonction des valeurs des paramètres testés .....	138
Tableau 16 : Paramètres choisis pour l'analyse du MEHP par UPLC-MS.....	139
Tableau 17 : Quantification du MEHP (n = 40) dans les milieux de cultures avant (t <sub>0h</sub> ) et après (t <sub>72h</sub> ) incubation en présence de MEHP à 10 µmol.L <sup>-1</sup> .....	147
Tableau 18 : Quantification du MEHP (n = 40) dans les culots cellulaires incubés à 10 µmol.L <sup>-1</sup> et dans les culots contrôles.....	147
Tableau 19 : Tableau de contingence obtenu par validation externe en ESI+ et en ESI- ....	162
Tableau 20 : Annotation et régulation des lipides discriminants entre les cellules incubées avec le MEHP et les cellules contrôles .....	164
Tableau 21 : Protocole suivi pour ajuster la température de colonne et le débit de phase mobile .....	176
Tableau 22 : Niveaux des facteurs introduits dans le plan composite centré .....	177
Tableau 23 : Matrice des essais du plan composite centré à 4 facteurs et 5 niveaux .....	178
Tableau 24 : Aire du pic chromatographique de l'acide arachidonique selon les valeurs des paramètres A, B, C et D dans le plan composite centré.....	189
Tableau 25 : Résumé des effets des différents paramètres, des interactions de premier ordre et des termes carrés.....	190
Tableau 26 : Résultats de l'analyse de la variance ANOVA et du défaut d'ajustement .....	192
Tableau 27 : Calcul du Δt <sub>R</sub> selon la formule reliant le temps de rétention au logP pour un mélange d'acides gras libres standards.....	202
Tableau 28 : Tableau récapitulatif des variables discriminantes annotées.....	204
Tableau 29 : Dosage des oxystérols dans les culots cellulaire JEG-3 incubés en présence de MEHP et dans les culots cellulaires contrôles.....	214
Tableau 30 : Liste des 15 gènes étudiés lors de l'analyse transcriptomique .....	219

Tableau 31 : Gènes dont l'expression est significativement augmentée ou diminuée dans les cellules JEG-3 suite à une incubation de 72 h à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MEHP (p-value < 0,05).....	220
Tableau 32 : Tableau de contingence obtenu par validation externe en ESI+ et ESI-.....	236
Tableau 33 : Annotation et régulation des lipides discriminants entre les cellules trophoblastiques incubées en présence de MEHP à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et les cellules contrôles...	238
Tableau 34 : Tableau de contingence obtenu par validation externe en ESI+ et ESI-.....	241
Tableau 35 : Annotation et régulation des lipides discriminants entre les cellules trophoblastiques incubées en présence de MEHP à 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et les cellules contrôles..	242
Tableau 36 : Régulation des espèces lipidiques communes entre les deux doses d'incubation.....	245
Équation 1 : Formule du coefficient de partage d'un analyte entre une phase organique et une phase aqueuse.....	84
Équation 2 : Formule de la résolution entre deux pics chromatographiques.....	185
Annexe 1 : Mélange de lipides standards utilisé pour l'analyse lipidomique globale.....	257
Annexe 2 : Régulation des 132 espèces lipidiques annotées lors de l'analyse lipidomique des cellules JEG-3.....	258
Annexe 3 : Mélange d'eicosanoïdes standards utilisé pour la mise au point de la méthode d'analyse.....	259
Annexe 4 : Mélange d'acides gras libres standards utilisé pour établir la relation linéaire entre $t_R$ et $\log P$ .....	260
Annexe 5 : Références des amorces utilisées pour l'analyse transcriptomique par RT-qPCR.....	261
Annexe 6 : Régulation des 115 lipides annotés lors de l'analyse lipidomique des cellules trophoblastiques.....	262
Annexe 7 : Régulation des 50 lipides annotés lors de l'analyse lipidomique des cellules trophoblastiques.....	263



## ABREVIATIONS ET ACRONYMES

24(S)-OH : 24(S) hydroxycholestérol

25-OH : 25 hydroxycholestérol

27-OH : 27 hydroxycholestérol

7-kéto : 7-céto hydroxycholestérol

7 $\beta$ -OH : 7 $\beta$  hydroxycholestérol

ACN : acétonitrile

AG : acides gras

APPI : *atmospheric pressure photoionization* / photoionisation à pression atmosphérique

AUC : *area under the curve* / aire sous la courbe

BHT : hydroxytoluène butylé

Cer : céramide

CHCl<sub>3</sub> : chloroforme

CHO : cholestérol

CTV : cytotrophoblastes villosus

CV : coefficient de variation

CV-ANOVA : *analysis of variance testing of cross-validated predictive residuals* / analyse de la variance des résidus prédictifs de la validation croisée

DBD : *DNA binding domain* / domaine de fixation de l'ADN

ddp : différence de potentiel

DEHP : di(2-éthylhexyl)phtalate

DG : diacylglycérol

DHET : acide dihydroxyeicoatriénoïque

ECN : *equivalent carbon number* / nombre équivalent de carbone

EET : acide époxyeicosatriénoïque

EI : étalon interne

ESI : *electrospray ionization* / électronebulisation

FABP : *fatty acid binding protein* / protéine de liaison des acides gras

FAT : *fatty acid translocase* / translocase des acides gras

FATP : *fatty acid transport protein* / protéine de transport des acides gras

hCG : hormone chorionique gonadotrope

HETE : acide hydroxyeicosatétrénoïque

HODE : acide hydroxyoctadécadiénoïque

hPL : hormone placentaire lactogène

IgG : immunoglobines G

IPr : isopropanol

LBD : *ligand binding domain* / domaine de fixation du ligand  
LDL : *low density lipoprotein* / lipoprotéine de faible densité  
LLE : *liquid liquid extraction* / extraction liquid-liquide  
LOD : limite de détection  
Loess : régression locale  
LOQ : limite de quantification  
LXR : *liver X receptor* / récepteur des stéroïdes  
 $m/z$  : rapport masse sur nombre de charges  
MEHP : mono(2-éthylhexyl)phtalate  
MeOH : méthanol  
MG : monoacylglycérol  
MS : *mass spectrometry* / spectrométrie de masse  
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem  
MTBE : *tert*-butyl méthyl éther  
NPLC : *normal phase liquid chromatography* / chromatographie liquide à polarité de phase normale  
OPLS-DA : *orthogonal partial least square discriminant analysis* / analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels orthogonale  
PA : acide phosphatidique  
PC : phosphatidylcholine  
PCA : *principal component analysis* / analyse en composantes principales  
PE : phosphatidyléthanolamine  
PG : phosphatidylglycérol  
PI : phosphatidylinositol  
PLS-DA : *partial least square discriminant analysis* / analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels  
PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor* / récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes  
PS : phosphatidylsérine  
QC : contrôle qualité  
QqQ : triple quadripôle  
Q-TOF : hybride quadripôle-temps de vol  
 $r$  : coefficient de corrélation  
ROC : *receiver operating characteristic*  
RPLC : *reversed phase liquid chromatography* / chromatographie liquide à polarité de phase inversée

RT-qPCR : *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* / réaction de polymérisation en chaîne quantitative d'un ADN complémentaire obtenu par transcription inverse d'une ARN messenger

RXR : *retinoid X receptor* / récepteur des rétinoïdes

S/N : rapport signal sur bruit

SM : sphingomyéline

SPE : *solid phase extraction* / extraction sur phase solide

SVM : *support vector machine* / machine à vecteurs de support

TG : triacylglycérol

TOF : *time of flight* / temps de vol

$t_R$  : temps de rétention

UPLC : *ultra performance liquid chromatography* / chromatographie liquide à ultra haute performance

VIP : *variable importance on projection* / importance de la variable dans la projection

VLDL : *very low density lipoprotein* / lipoprotéine de très faible densité



# Préambule



Le sujet de cette thèse s'inscrit dans une problématique globale visant à étudier l'effet de contaminants chimiques, de polluants environnementaux ou de toxiques sur la santé humaine et particulièrement sur la grossesse. En effet, le déroulement de la grossesse et le développement du fœtus peuvent être altérés par la présence de contaminants chimiques dans l'environnement maternel. Ces derniers peuvent atteindre le fœtus par passage de la barrière placentaire, mais également agir directement sur le placenta et perturber le développement de celui-ci. Le placenta est un organe indispensable à la croissance fœtale et, toute dérégulation agissant sur son développement peut avoir de graves conséquences sur la grossesse et la santé de l'enfant à naître. La formation du placenta est caractérisée par la différenciation cellulaire des trophoblastes. Il s'agit de cellules clés de cet organe qui sont étroitement régulées par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . En effet, l'activation de ce récepteur par des ligands spécifiques conduit à l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'invasion et la fusion des trophoblastes d'une part et dans le métabolisme lipidique placentaire d'autre part. Ainsi, l'activation de PPAR $\gamma$ , par des ligands exogènes non naturels, pourrait entraîner des perturbations lipidiques au niveau des cellules placentaires et, de fait, avoir des répercussions sur le développement du placenta et du fœtus. Parmi les ligands de PPAR $\gamma$ , le mono(2-éthylhexyl)phtalate présente une forte affinité pour le récepteur nucléaire et induit son activation. Les phtalates sont des contaminants chimiques dont certains sont reprotoxiques et perturbateurs endocriniens ; ils sont ajoutés aux matières plastiques et sont présents de manière ubiquitaire dans l'environnement. Dans ce contexte, l'étude présentée dans cette thèse est fondée sur l'hypothèse que l'activation de PPAR $\gamma$  par le mono(2-éthylhexyl)phtalate pourrait engendrer une perturbation du lipidome des cellules placentaires pouvant, à son tour, entraîner des complications au cours de la grossesse. Afin d'explorer cette hypothèse, différentes études ont été réalisées.

Dans un premier temps, des cellules issues d'une lignée cellulaire placentaire ont été incubées en présence de MEHP. La dose d'incubation effective des cellules a été évaluée par dosage de ce phtalate dans le milieu de culture et dans les culots cellulaires recueillis.

Des analyses du lipidome de ces culots cellulaires (analyse lipidomique globale, des eicosanoïdes et des oxystérols) ont ensuite été effectuées afin de rechercher d'éventuelles perturbations dues à l'exposition au MEHP.

Les changements du lipidome observés ont ensuite permis d'orienter une analyse transcriptomique vers certains des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique placentaire. Il s'agissait de rechercher d'éventuelles modifications dans l'expression de ces gènes consécutives à l'incubation des cellules au phtalate.

Enfin, l'obtention de cellules issues de cultures primaires de trophoblastes, plus représentatives du placenta, a permis de réaliser une nouvelle analyse lipidomique et de comparer les résultats obtenus à ceux de la lignée cellulaire.

# Introduction

## I. Le placenta humain

Le placenta est un organe transitoire se développant dès le huitième jour de la fécondation et expulsé lors de l'accouchement. Il est indispensable à la croissance et au développement fœtal de par son rôle de barrière permettant les échanges gazeux et nutritifs entre la mère et le fœtus.

Le développement du placenta humain est caractérisé par une invasion majeure de cellules, les trophoblastes. Une couche unique de ces cellules placentaires sépare le sang fœtal du sang maternel, ce qui permet au tissu fœtal (chorion) d'être en contact direct avec le sang maternel (Figure 1). Cette particularité est propre aux primates supérieurs, dont l'espèce humaine, et au cobaye <sup>1</sup>.

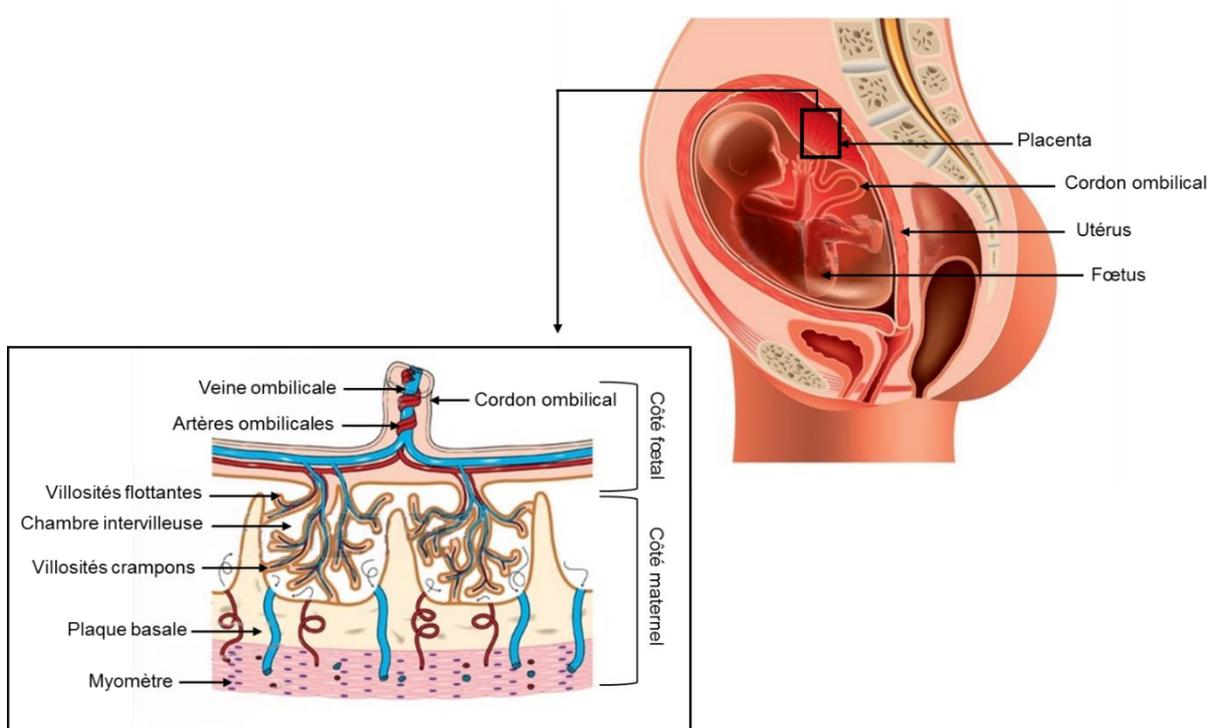


Figure 1 : Le placenta humain (d'après <sup>2</sup>)

### A. Le développement placentaire

Le développement du placenta se fait en trois stades : prélacunaire, lacunaire et vilieux <sup>3-6</sup>. Il commence dès les premiers jours après fécondation et continue jusqu'à la fin du premier trimestre.

## 1. Les étapes de développement du placenta

Le stade prélacunaire commence environ six jours après la fécondation. L'embryon alors appelé blastocyste, entre en contact avec l'épithélium utérin. Dès lors, les cellules trophoblastiques entourant le blastocyste se différencient en assise cellulaire interne, constituée de cytotrophoblastes, et en assise cellulaire externe, le syncytiotrophoblaste (Figure 2). Ce dernier va pouvoir pénétrer l'épithélium utérin et envahir l'endomètre afin d'enfouir le blastocyste. Cette étape constitue la nidation.

Vers le huitième jour suivant la fécondation, correspondant au développement lacunaire, des vacuoles se forment dans le syncytiotrophoblaste. Ces vacuoles vont progressivement former des lacunes délimitant des travées de syncytium (Figure 2).

Le stade vilieux apparaît autour du douzième jour après fécondation. Les cytotrophoblastes prolifèrent et colonisent les travées de syncytium pour former les villosités chorales primaires. À partir du quinzième jour, ces villosités primaires sont envahies par du mésenchyme embryonnaire, constituant alors les villosités secondaires. Environ 21 jours après fécondation, des capillaires fœtaux se forment dans l'axe mésenchymateux, ce qui caractérise la structure tertiaire de la villosité chorale (Figure 2).

Le placenta atteint sa structure définitive à la fin du premier trimestre. Il forme alors un disque de 20 cm de diamètre, de 3 cm d'épaisseur et pèse environ 500 g, soit 1/6 du poids du fœtus. Il peut être séparé, schématiquement, en deux parties : les villosités flottantes, situées vers le fœtus et baignant dans la chambre intervillieuse, et les villosités crampons, ancrées dans l'endomètre maternel (Figure 1).

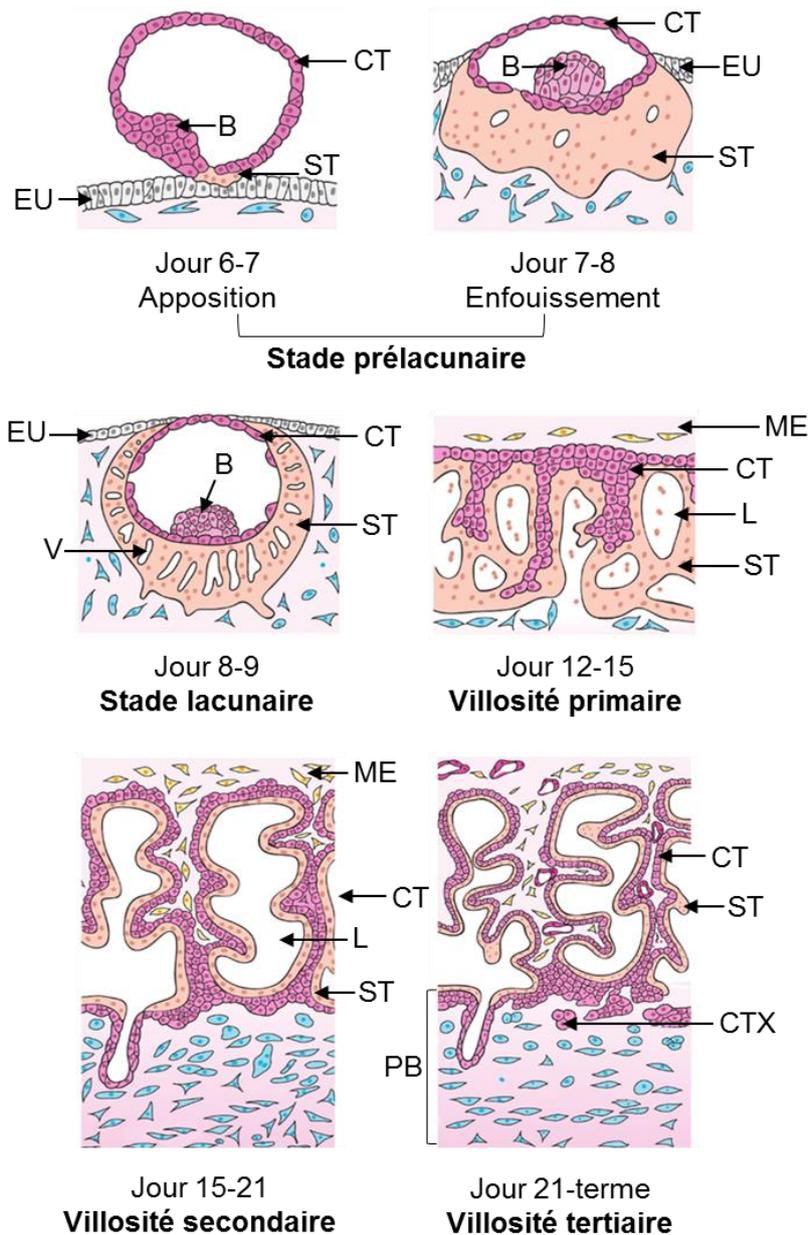


Figure 2 : Représentation schématique des principales étapes du développement placentaire humain (d'après <sup>3</sup>)  
 B : blastocyste, CT : cytotrophoblastes, ST : syncytiotrophoblastes, EU : épithélium utérin, V : vacuoles,  
 ME : mésenchyme embryonnaire, L : lacunes, CTX : cytotrophoblastes extravilloux, PB : plaque basale

## 2. Le cytotrophoblaste

La villosité chorale tertiaire représente l'unité structurale et fonctionnelle du placenta (Figure 3). Elle est composée d'un axe mésenchymateux embryonnaire contenant les vaisseaux sanguins fœtaux. Cet axe est bordé d'une monocouche de cytotrophoblastes vilieux qui, après fusion, forment le syncytiotrophoblaste <sup>7</sup>.

Au cours du premier trimestre, l'endomètre utérin est envahi par les cytotrophoblastes extravilloux <sup>8</sup>. Cette invasion profonde est caractéristique du placenta humain. Les cytotrophoblastes extravilloux, localisés à la base de la villosité crampon, sont agrégés entre

eux et reposent sur une plaque basale. A la base de cette villosité, les cellules prolifèrent, puis se différencient en cytotrophoblastes très invasifs qui envahissent l'endomètre et le myomètre (Figure 2 et Figure 3) <sup>9</sup>.

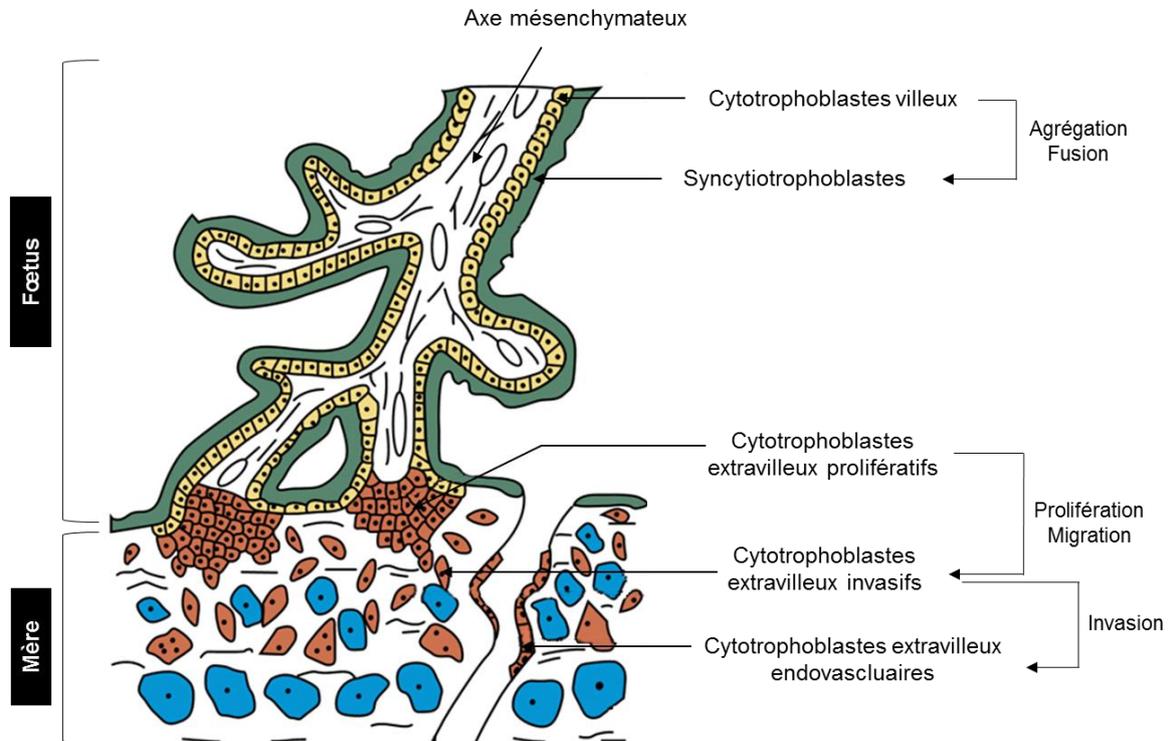


Figure 3 : La villosité chorale ancrée, unité structurale et fonctionnelle du placenta (d'après <sup>7</sup>)

Cette invasion trophoblastique est très étroitement régulée tant du point de vue spatial que temporel. Elle est limitée au tiers supérieur du myomètre et les trophoblastes extravilloux n'envahissent que les parois des artères utérines. Le développement du placenta humain met en lumière un modèle unique d'invasion cellulaire contrôlée, orientée et sélective.

## B. Les fonctions placentaires

Le placenta est doté de trois fonctions majeures permettant le développement et la protection du fœtus : une fonction d'échanges, de filtre et endocrine.

### 1. Fonctions d'échanges

Une des fonctions biologiques essentielles du placenta est la coordination des échanges fœto-maternels. Ces échanges, de type gazeux et nutritifs, ont lieu dans la chambre intervillieuse des villosités flottantes <sup>9</sup>. Les transferts se font par différents mécanismes : simple diffusion, diffusion facilitée, transport actif ou endocytose (Figure 4). La simple diffusion est

régie par un équilibre de concentration entre le compartiment maternel et le compartiment fœtal. Elle permet, en outre, le passage de l'urée, de la créatinine, de certains acides gras et de différents gaz (dioxygène, dioxyde de carbone). Le moteur de la diffusion facilitée, à l'instar de la simple diffusion, est la différence de concentration entre les deux compartiments : fœtal et maternel. Cependant, des protéines de transport sont également nécessaires pour permettre le passage des molécules. Ce transport ne requiert pas d'énergie et permet, entre autre, le passage du glucose, qui est la principale source d'énergie du fœtus.<sup>8</sup> Le transport actif permet, quant à lui, le transfert des molécules contre le gradient de concentration. Ce transfert ne peut se faire spontanément dans la cellule et requière donc de l'énergie, généralement apportée par l'hydrolyse de l'ATP. Les ions de type sodium, potassium, calcium ainsi que les acides aminés sont transportés vers le fœtus par ce type de transfert. Enfin, l'endocytose permet l'internalisation des molécules à l'intérieur des cellules. Ce transfert se fait *via* des récepteurs au niveau des microvillosités et permet le transport des lipoprotéines de faible densité (LDL) et des immunoglobines G (IgG).

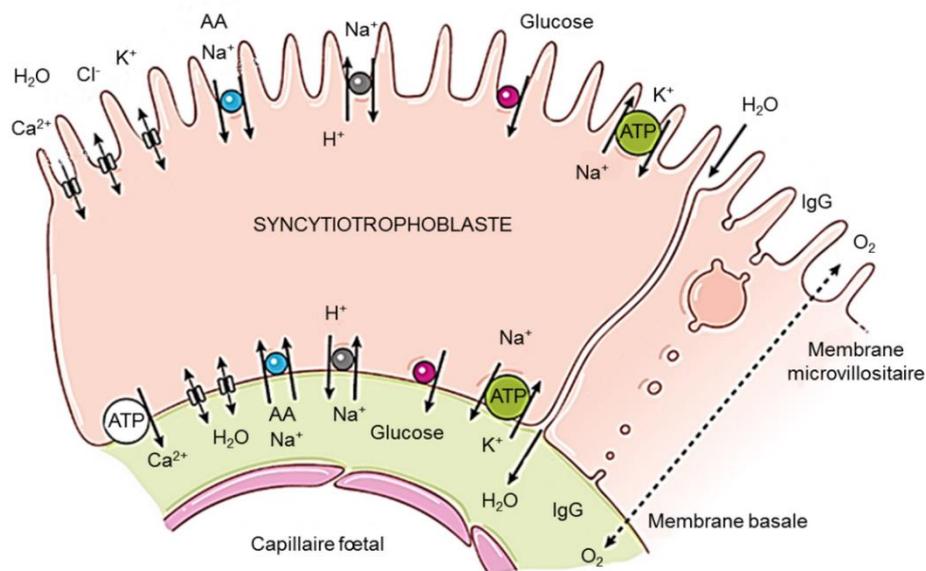


Figure 4 : Principales voies de transfert du syncytiotrophoblaste (d'après <sup>10</sup>)

Les échanges se font selon les mécanismes classiques : simple diffusion pour l'O<sub>2</sub>, diffusion facilitée pour le glucose, co-transport pour les acides aminés (AA)/Na<sup>+</sup>, échangeur H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>, transport actif pour les ions Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, endocytose pour les IgG.

D'une manière générale, les principaux échanges, ayant lieu à l'interface fœto-maternelle, sont de types gazeux et nutritifs. Un apport de dioxygène vers le fœtus et une élimination de dioxyde de carbone par la mère, se produit par simple diffusion. Des échanges de nutriments de type eau, sels minéraux, protéines, glucides, lipides, vitamines et hormones, ont également lieu. En ce qui concerne les lipides, les triacylglycérols ainsi que les phospholipides sont

dégradés au niveau du placenta. Dans cet organe, une synthèse *de novo* de ces lipides existe également. Une forte activité de synthèse d'acides gras a lieu au niveau du placenta. Elle ne concerne cependant pas les acides gras essentiels tels que l'acide linoléique et l'acide arachidonique dont l'apport, d'origine alimentaire, passe obligatoirement par les échanges fœtaux-maternels.

Le passage de ces différentes molécules est donc une nécessité pour le bon développement du fœtus. Le placenta se comporte comme une membrane perméable permettant aux gaz et nutriments d'atteindre le fœtus ou d'être éliminés dans le sang maternel. Cette perméabilité peut, néanmoins, avoir des conséquences néfastes sur la grossesse car certains toxiques, virus et agents infectieux peuvent également traverser le placenta et atteindre le fœtus.

## 2. Fonctions de filtres

Le placenta humain agit comme une barrière afin de protéger le fœtus. La barrière placentaire protège l'embryon d'une grande partie des agents infectieux, pathogènes et toxiques grâce à sa richesse en cellules immunitaires : les monocytes et les macrophages. Malheureusement, il ne s'agit que d'une protection partielle. En effet, les virus, notamment ceux de la rubéole, des hépatites et du virus de l'immunodéficience acquise humaine, traversent aisément la barrière placentaire, tout comme d'autres agents infectieux tels que la syphilis et la toxoplasmose. De nombreux médicaments ne traversent pas la barrière placentaire ; ce n'est pas le cas des alcools, des opiacés et des rétinoïdes <sup>11</sup>. Le fait que la barrière placentaire soit imparfaite est, dans certains cas, favorable au fœtus. Ainsi, l'acquisition des IgG par le fœtus se fait exclusivement *via* le placenta et permet au nouveau-né d'acquérir des défenses immunitaires avant que son propre système de défense ne se développe <sup>12-14</sup>.

## 3. Fonctions endocrines

Le placenta joue un rôle très important dans la sécrétion hormonale, notamment dans la production d'hormones peptidiques et stéroïdiennes. Cette fonction endocrine est nécessaire pour le bon déroulement de la grossesse et du développement fœtal.

Dès la huitième semaine de grossesse, le placenta sécrète des hormones stéroïdiennes telles que les œstrogènes et la progestérone. Cette dernière permet le maintien de la grossesse <sup>15</sup>. Les œstrogènes, quant à eux, participent au développement et à la croissance

de l'ensemble foëto-placentaire. Ils sont également impliqués dans le maintien du flux sanguin utéroplacentaire <sup>16</sup>.

Le placenta est capable de synthétiser de nombreuses hormones polypeptidiques telles que l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) et l'hormone placentaire lactogène (hPL) <sup>17,18</sup>. L'hCG est synthétisée dès le septième jour de grossesse et jusqu'à l'accouchement. Cette hormone est essentielle au maintien du corps jaune, la glande sécrétrice de progestérone, et joue un rôle dans la différenciation trophoblastique et donc, dans le développement précoce du placenta. L'hPL est synthétisée dès la troisième semaine de gestation. Il s'agit de l'hormone peptidique la plus abondamment produite par le placenta humain. Son rôle majeur est d'assurer un apport nutritif et énergétique suffisant au foetus. Elle est donc un marqueur du bien-être foetal.

### C. Les modèles d'étude du placenta humain

Le placenta humain est un organe unique, de fait, les études effectuées à partir de modèle animal ne peuvent être extrapolées à l'Homme <sup>19</sup>. L'étude des cytotrophoblastes extravilleux a longtemps été exclusivement descriptive, se limitant à l'analyse de coupes histologiques placentaires. Le placenta humain étant un organe difficile à obtenir pour des raisons éthiques, de nouveaux modèles d'étude *in vitro* ont été mis au point afin d'étudier les cytotrophoblastes extravilleux et les mécanismes impliqués dans l'invasion trophoblastique.

#### 1. Les cultures d'explants

La culture d'explants est obtenue à partir d'une villosité choriale du premier trimestre. Un fragment de 1 à 2 mm<sup>3</sup> est mis en culture sur une matrice spécifique plus ou moins épaisse (Matrigel ou collagène de type I) ou au contact d'un fragment de décidue. À l'extrémité de la villosité, des cellules épithéliales apparaissent. Ces cellules expriment les marqueurs des trophoblastes extravilleux, décrits *in situ*. Ce modèle cellulaire offre l'avantage de pouvoir étudier le comportement de ces derniers dans un environnement relativement proche du milieu *in vivo* <sup>20,21</sup>. En revanche, ces cellules ne prolifèrent pas et ne peuvent pas être cultivées. De plus, leur survie reste limitée à 24 voire 48 h.

#### 2. Les cultures primaires

Les cytotrophoblastes extravilleux sont isolés à partir de villosités crampons du premier trimestre, par digestion enzymatique douce (trypsine et DNase de type IV). Les cellules sont ensuite séparées sur gradient de densité (Percoll), puis cultivées en monocouche sur une matrice extracellulaire (laminine, fibronectine ou Matrigel) <sup>22-24</sup>. La pureté de la préparation en

trophoblastes dépend de plusieurs facteurs : l'origine, la qualité et le temps d'action des enzymes utilisées. De ce fait, une estimation du taux de contamination (par les cellules mésenchymateuses) est préconisée pour chaque préparation <sup>25</sup>. Les cellules, ainsi obtenues, expriment les marqueurs des trophoblastes extravilleux <sup>26</sup>.

### 3. Les lignées cellulaires

Face à la difficulté d'obtenir des cultures d'explants ou des cultures primaires, de nombreuses études sont réalisées sur des modèles plus simples à mettre en œuvre : les lignées cellulaires. Deux types de lignées peuvent être utilisés : cancéreuses et non-cancéreuses.

#### 3.1. Les choriocarcinomes

Les choriocarcinomes sont des tumeurs placentaires d'origine trophoblastique. Diverses lignées issues de choriocarcinomes ont été établies : BeWo, JAR et JEG-3. Ces trois lignées aneuploïdes car possédant un nombre anormal de chromosomes, ont conservé certaines propriétés du trophoblaste, notamment la capacité de sécrétion d'hCG, d'hPL et de progestérone <sup>27-29</sup>. Les lignées BeWo et JEG-3 sont mononucléées, la seconde étant un clone de la première, elles présentent donc le même profil ADN. Les cellules JAR, quant à elles, sont issues de la mise en culture directe de cellules provenant d'une biopsie de choriocarcinome. Ces lignées sont largement utilisées dans les études de phénomènes d'invasion cellulaire et, dans le cas des cellules BeWo, dans les études de fusion cellulaire. En effet, ces dernières ont, *in vitro*, la capacité de fusionner en présence d'AMP cyclique <sup>30</sup>.

Les choriocarcinomes sont donc des modèles d'études placentaires plus faciles d'accès que les cultures d'explants ou les cultures primaires. De plus, en raison de leur immortalité, ils offrent l'avantage de pouvoir proliférer presque indéfiniment. Cependant, les choriocarcinomes sont composés de populations cellulaires hétérogènes (cytotrophoblastes villosités, extravilleux et syncytiotrophoblastes). De ce fait, ils ne permettent pas l'étude de fonctions spécifiques à chaque type de cytotrophoblastes. En revanche, ils peuvent, tout de même, constituer un bon modèle dans le cadre d'études toxicologiques.

#### 3.2. Les lignées non tumorales

Certaines lignées cellulaires trophoblastiques ne proviennent pas de choriocarcinomes mais de la transformation spontanée des cellules au cours de la culture. C'est le cas des cellules HTR-8, isolées par Irving et al en 1995 <sup>31</sup>. Cependant, les lignées sont généralement

immortalisées par la transfection de gènes viraux (virus Simien 40). Parmi les lignées transfectées, on retrouve les HTR-8/SVneo, RSVT2 <sup>32</sup>, HIPEC65 <sup>33</sup>, SGHPL-4, SGHPL-5 <sup>34</sup>, Swan 71 <sup>35</sup>, SPA-26 <sup>36</sup>, TCL-1 <sup>37</sup> ou encore TEV-1 <sup>38</sup>. Chaque lignée possède des caractéristiques phénotypiques définissant leur origine trophoblastique et leur état de différenciation. L'immortalisation des cellules pouvant conduire à la perte de certaines de ces caractéristiques, il est important de définir des marqueurs de cytotrophoblastes extravilloux afin de justifier l'utilisation de ces lignées. Ainsi, d'après les membres du Groupe Européen sur le Placenta (EPG), ces marqueurs sont la cytokératine 7 (CK07), l'antigène des leucocytes humain HLA-G et le cluster de différenciation CD9. La CK07 est un marqueur des cellules trophoblastiques dans le placenta humain tandis que l'HLA-G et le CD9 sont spécifiques des cytotrophoblastes extravilloux <sup>39</sup>. Toutefois, l'utilisation d'autres marqueurs de caractérisation, tels que les intégrines ou les hormones placentaires, semble nécessaire car de nombreuses lignées n'expriment pas l'ensemble des marqueurs précédemment cités <sup>40,41</sup>.

Ainsi, différents modèles d'étude du placenta sont disponibles et présentent chacun des avantages et des inconvénients. Dans le cadre de l'étude conduite durant la préparation de mon doctorat, je me suis intéressée à l'effet de l'incubation en présence d'un contaminant chimique sur le lipidome de cellules issues, dans un premier temps, de la lignée cellules JEG-3. Dans un second temps, l'étude a été réalisée sur des cultures primaires de trophoblastes, plus représentatives des cellules trophoblastiques.

#### D. Anomalies pathologiques du placenta

Le placenta étant un organe à part entière, un certain nombre d'anomalies pathologiques peuvent le toucher et engendrer des perturbations de la grossesse et du développement fœtal. Parmi ces anomalies on distingue celles à caractères génétiques et/ou chromosomiques et celles dues à des facteurs environnementaux.

##### 1. Anomalies génétiques et/ou chromosomiques : exemple de la prééclampsie

Différentes anomalies, génétiques ou chromosomiques, peuvent toucher le placenta et avoir des répercussions importantes sur le déroulement de la grossesse et/ou sur le développement du fœtus. Parmi ces anomalies, se distinguent le retard de croissance intra-utérin (RCIU) et la prééclampsie. Le retard de croissance intra-utérin caractérise une complication de la grossesse, se traduisant par une croissance insuffisante du fœtus. Cette pathologie concerne 3 à 10 % des grossesses. Elle peut être d'origine maternelle, fœtal ou placentaire et être à l'origine d'une atteinte des fonctions cérébrales, de maladies

cardiovasculaires et d'un risque accru de mortalité <sup>42-44</sup>. Le RCIU d'origine placentaire provient, généralement, d'une grossesse prééclampsique.

### 1.1. *Épidémiologie de la prééclampsie*

La prééclampsie est un syndrome complexe de la grossesse spécifique à l'espèce humaine. En France, elle touche environ 5 % des grossesses chez les femmes nullipares et 2 % chez les femmes multipares. Ce syndrome est considéré comme gravidique en raison des complications sévères qu'il peut engendrer chez la mère et le fœtus, notamment des risques d'hémorragie cérébrale et de mortalité fœtale. Un certain nombre de facteurs de risque existent, en particulier d'origine génétique <sup>45</sup>. Des antécédents de prééclampsie chez la mère augmentent le risque de grossesses prééclampsiques chez la fille <sup>46</sup>. Cependant, des études récentes tendent à montrer que l'implication n'est pas exclusivement maternelle et que des pères issus de grossesses prééclampsiques sont également susceptibles d'engendrer des grossesses prééclampsiques chez leur partenaire <sup>47-49</sup>. D'autres facteurs de risques sont également répertoriés tels que la primiparité, un âge maternel élevé, les grossesses multiples, l'obésité, l'hypertension artérielle, le stress physique et psychologique <sup>45</sup>.

### 1.2. *Signes cliniques et biologiques*

La prééclampsie est définie par l'association de trois symptômes maternels : une hypertension artérielle (PAS >140 mm Hg et/ou PAD >90 mm Hg), une protéinurie (>0,3 g/24h) et des œdèmes généralisés.

L'hypertension artérielle est le signe clinique permettant le diagnostic de la prééclampsie <sup>50</sup>. D'autres signes peuvent être recherchés, et annoncent généralement une crise d'éclampsie. Ces signes se manifestent sous forme d'œdèmes généralisés, de céphalées intenses, de troubles visuels, d'acouphènes, de troubles neuropsychologiques, de contractions musculaires vives, de douleurs abdominales intenses et de production anormalement basse d'urine <sup>50</sup>.

Outre les signes cliniques, des signes biologiques, tels que la protéinurie, peuvent être indicatif d'une prééclampsie. Cette dernière, indispensable au diagnostic de ce syndrome, peut dépasser 3 g/j dans le cas de grossesses avec complication <sup>51</sup>. Un taux anormal d'acide urique dans le sang, une insuffisance rénale, des troubles de la coagulation et une hémococoncentration sont d'autres signes biologiques pouvant caractériser ce syndrome.

Enfin, l'échographie peut être indicative en cas de prééclampsie. En effet, elle permet d'apprécier la croissance et la vitalité fœtale (estimation du poids, vitesse de croissance, mouvements actifs, quantité de liquide amniotique).

### 1.3. *Physiopathologie de la prééclampsie*

La physiopathologie de la prééclampsie reste, à ce jour, peu connue. Cependant, un schéma physiopathologique peut être proposé grâce aux données moléculaires récentes et aux études anatomopathologiques plus anciennes. Ce schéma comporte différentes étapes (Figure 5) :

- un défaut d'invasion trophoblastique responsable d'une diminution de la vascularisation de la chambre intervillieuse <sup>52</sup> ;
- un terrain maternel prédisposé associant des facteurs génétiques et environnementaux modulés par les adaptations métaboliques de la grossesse ;
- un stress oxydant et une hypoxie placentaire induisant un dysfonctionnement généralisé du syncytiotrophoblaste <sup>53,54</sup> ;
- un dysfonctionnement de l'endothélium maternel dû aux substances libérées par le placenta dans la circulation maternelle, notamment des lipides oxydés, des radicaux libres et des cytokines, et conduisant aux signes cliniques de ce syndrome <sup>55,56</sup>.

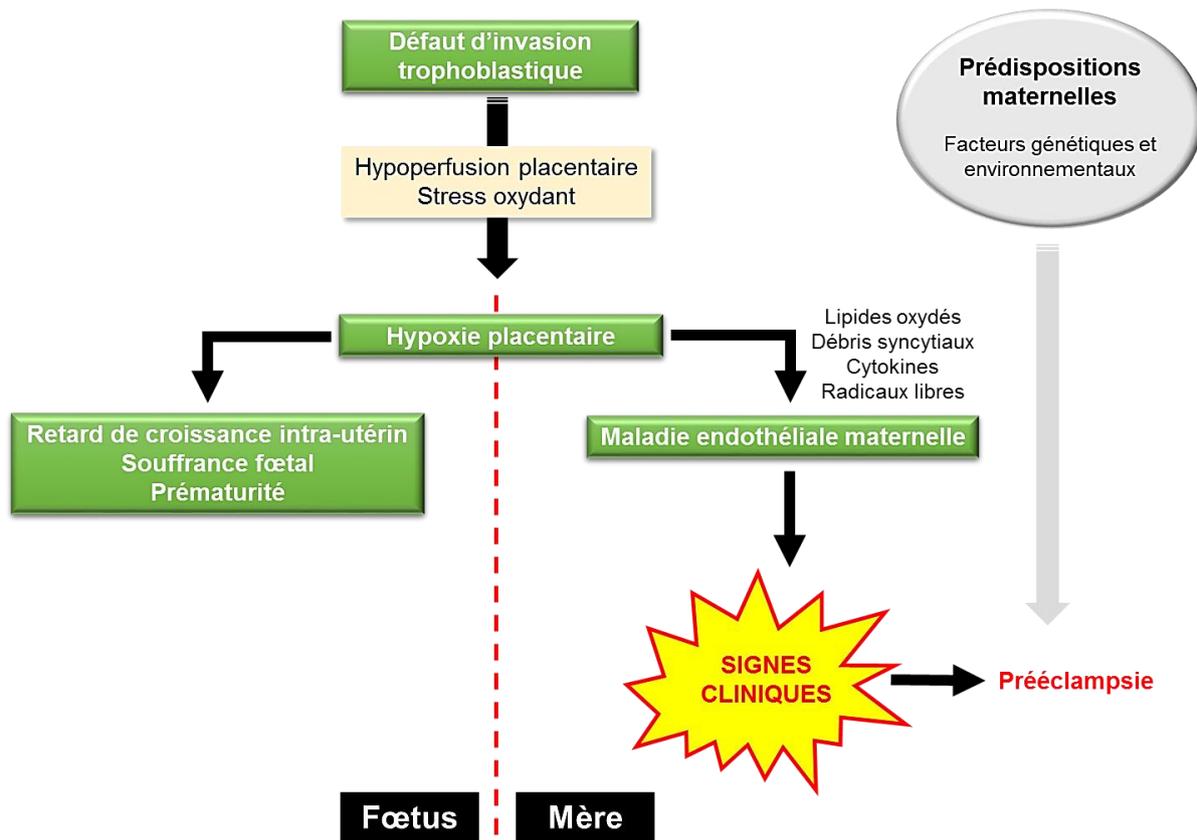


Figure 5 : Schéma simplifié de la physiopathologie de la prééclampsie (d'après <sup>57</sup>)

#### 1.4. Biomarqueurs associés à la prééclampsie

Afin d'éviter au maximum les complications liées à la prééclampsie, il serait nécessaire d'établir un diagnostic précoce de ce syndrome, ce qui n'est pas le cas actuellement. Toutefois, certains des marqueurs biologiques associés à un syndrome prééclamptique pourraient permettre de poser le diagnostic de celui-ci suffisamment tôt. Il s'agit, en général, de facteurs impliqués dans le défaut d'invasion trophoblastique, de facteurs de prédisposition maternels ou encore d'un stress oxydatif <sup>51,57,58</sup>. Des études portant sur le métabolome d'échantillons tissulaires de placentas prééclamptiques, de sérum, de plasma et d'urine collectés chez des femmes prééclamptiques ont montré une perturbation du profil lipidique et lipoprotéinique. Les résultats de ces études montrent une augmentation significative des triacylglycérols, des acides gras libres, des phospholipides, du cholestérol, de l'acide urique et des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) chez les femmes prééclamptiques <sup>59-62</sup>. Ces études concluent qu'une dyslipidémie et qu'une augmentation en acide urique sont caractéristiques de la prééclampsie chez les femmes nullipares au troisième trimestre de grossesse <sup>60</sup>. Au vu de ces résultats, suivre l'évolution de la concentration de certains lipides sanguins chez la femme enceinte au cours de la grossesse pourrait s'avérer pertinent pour prévenir la survenue d'une prééclampsie.

## 2. Facteurs environnementaux

Outre les différents facteurs génétiques précédemment cités, certains pathogènes peuvent traverser la barrière placentaire, entraînant des perturbations potentielles de la grossesse et constituant un risque pour le fœtus (*cf* Les fonctions placentaires).

### 2.1. Infections bactériennes et virales

Les virus, en particulier, traversent aisément le placenta ; c'est le cas du cytomégalovirus et de ceux à l'origine de la rubéole, de la toxoplasmose et du VIH<sup>63-66</sup>. Lorsqu'elle n'intervient pas au cours de la grossesse, la rubéole est une infection bénigne, passant souvent inaperçue. En revanche, chez la femme enceinte, cette infection peut avoir des conséquences graves sur le fœtus. Effectivement, si elle est contractée pendant les 20 premières semaines de grossesse, le virus est transmis au fœtus et, à la naissance, le bébé est atteint d'une rubéole congénitale. Les conséquences sur l'enfant sont alors variables, les effets les plus courants étant des troubles oculaires, auditifs, cardiaques et neurologiques<sup>67</sup>.

D'autres pathogènes peuvent, également, avoir des répercussions sur la santé du fœtus, c'est le cas du parasite protozoaire *Toxoplasma gondii*, à l'origine de la toxoplasmose. Tout comme le virus de la rubéole, la toxoplasmose est, généralement, bénigne et asymptomatique en dehors de la grossesse mais peut entraîner de graves complications lorsque le parasite atteint le fœtus. On parle alors de toxoplasmose congénitale. Le risque de passage placentaire est d'autant plus élevé que l'infection survient tardivement. En effet, en début de grossesse, ce risque est faible, estimé à 6 %, mais les conséquences sont, en revanche, d'autant plus graves, pouvant aller jusqu'au décès *in utero*<sup>68</sup>. En fin de grossesse, le risque de passage est d'environ 80 %, mais les conséquences sur le fœtus, généralement des lésions oculaires, ne sont plus mortelles<sup>69</sup>.

Le placenta est donc exposé à un risque important d'infections bactériennes et virales qui peuvent atteindre le fœtus et avoir de graves conséquences sur son développement. Ces pathogènes ne sont, malheureusement, pas les seuls à pouvoir traverser le placenta, c'est également le cas de certains xénobiotiques pouvant être des perturbateurs endocriniens.

### 2.2. Perturbateurs endocriniens

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études scientifiques ont mis en évidence les effets de certaines substances chimiques environnementales sur les organes

et/ou sur les fonctions de reproduction. L'impact de ces substances sur le système hormonal est aujourd'hui une préoccupation majeure de la communauté scientifique. De nombreuses études visent à comprendre le rôle de ces substances dites « perturbateurs endocriniens », ainsi que leurs modes d'actions et leurs effets sur la santé humaine.

### 2.2.1. Définition et origine

La première définition du terme perturbateur endocrinien a été donnée en 1996, lors d'un colloque organisé par différents organismes européens de santé. Il est alors défini comme une « substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur celui-ci ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale »<sup>70</sup>. Le Programme International sur la Sécurité Chimique de l'Organisation Mondiale de la Santé a complété cette définition en 2002 en caractérisant les perturbateurs endocriniens comme étant « une substance ou un mélange exogène altérant une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoquant de ce fait des effets néfastes sur la santé de l'organisme intact ou sur celle de sa descendance ». Cette définition est aujourd'hui la plus communément admise.

Bien que cette définition ait été proposée dans les années 90, la notion de perturbateurs endocriniens a émergé bien plus tôt suite à une crise sanitaire intervenue dans les années 1940-1950. À cette époque, une hormone de synthèse, le diéthylstilbestrol, commercialisé sous le nom de Distilbène®, est prescrite aux femmes enceintes pour prévenir le risque de fausse couche. Plusieurs années après la commercialisation de ce produit, des anomalies génitales, de type hypotrophies testiculaires et malformations vaginales, ainsi que des formes inhabituelles de cancer de l'utérus, du vagin et du sein, ont été observées chez les enfants exposés *in utero*<sup>71-73</sup>. Les effets de cette molécule sont, de plus, toujours observables chez les enfants de la troisième génération<sup>74,75</sup>.

Plus récemment, les effets mesurés du bisphénol A ont fait prendre conscience de l'enjeu majeur que représentent les perturbateurs endocriniens pour la santé. Le bisphénol A, substance chimique de synthèse, est utilisé depuis plus de 50 ans dans la fabrication de certains plastiques, notamment en tant que plastifiant dans les biberons et révélateur de coloration dans les papiers de type tickets de caisse<sup>76-78</sup>. En 2011, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), conclue à l'existence d'effets perturbateurs endocriniens du bisphénol A, avérés chez l'animal (effets sur la reproduction, le métabolisme et le comportement) et suspectés chez l'Homme (effets sur la reproduction, le métabolisme et pathologies cardiovasculaires). Des mesures de précautions sont mises en place, recommandant notamment la substitution de cette molécule dans les matériaux susceptibles d'être au contact des denrées alimentaires. À la suite des travaux de l'ANSES sur le bisphénol A, les études faites sur les perturbateurs endocriniens prennent une

envergure internationale et divers organismes se penchent sur la question de leur identification et classification <sup>79-81</sup>.

### 2.2.2. Identification et classification

Suite aux différentes crises sanitaires, les études sur les perturbateurs endocriniens ont connu un véritable essor. Il est apparu, alors, important de pouvoir les répertorier, ce qui reste difficile aujourd'hui en raison de leur grande diversité chimique. En effet, ils appartiennent à différentes familles de substances chimiques telles que les organochlorés, les esters de phtalates, les parabènes, les pesticides, etc. Les principales sources de perturbateurs endocriniens avérés ou potentiels sont regroupées dans le Tableau 1.

En 2002, la Commission européenne a établi une classification des perturbateurs endocriniens, différenciant ainsi les perturbateurs endocriniens avérés (catégorie 1), pour lesquels l'effet perturbateur du système endocrinien *in vivo* a été prouvé, des perturbateurs endocriniens potentiels (catégorie 2), pour lesquels les données *in vitro* indiquent une possible perturbation endocrinienne. Dans ces deux catégories, sont classés le bisphénol A, les parabènes, les pesticides ou encore les phtalates et notamment le di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP), considéré perturbateur endocrinien avéré par le comité d'experts de la communauté européenne <sup>82</sup>.

Tableau 1 : Principales sources de perturbateurs endocriniens (d'après <sup>82</sup>)

Sources	Molécules
Produits pharmaceutiques	Éthinyl-estradiol Kétokonazole
Produits dentaires	Bisphénol A
Produits à usages industriels ou domestiques	Phtalates Bisphénol A Polybromodiphényles Polychlorobiphényles Alkylphénols, nonylphénols Parabènes Dioxines
Produits phytosanitaires	Insecticides (lindane, endosulfan) Herbicides (alachlore, atrazine) Organochlorés Fongicides (vinchlozoline)
Phytoestrogènes	Isoflavone
Mycotoxines	Zearalénone

### 2.2.3. Fenêtre d'exposition et conséquences cliniques

Une des particularités des perturbateurs endocriniens réside dans le fait que leurs effets sur la santé peuvent différer en fonction de la période d'exposition. Ainsi, la période fœtale et la petite enfance sont-elles les périodes les plus sensibles à l'exposition car il s'agit de périodes critiques du développement. Le fœtus constitue donc une cible très sensible aux perturbateurs endocriniens car son mécanisme de régulations n'est pas encore totalement développé. Il s'ensuit que la femme enceinte est considérée plus vulnérable aux perturbateurs endocriniens. Ainsi, un contrôle strict doit-il être mis en place afin de limiter l'exposition à ces perturbateurs durant la grossesse.

Une exposition *in utero* peut avoir de lourdes conséquences sur la santé directe du fœtus, comme dans le cas du Distilbène<sup>®</sup>, mais également des effets retardés, pouvant se manifester à un âge ultérieur tels que des cancers hormono-dépendants et des atteintes neurologiques<sup>83-85</sup>. Il apparaît, alors, important de connaître les différents mécanismes d'actions de ces perturbateurs endocriniens afin d'essayer de les bloquer et, de ce fait, limiter leurs effets.

### 2.2.4. Mécanismes d'action

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir à différents niveaux, en particulier dans la synthèse, le transport, la libération, l'élimination et/ou le stockage d'hormones. Leur action se porte généralement sur des voies contrôlées par des récepteurs nucléaires, constituant les cibles naturelles des hormones<sup>82,86</sup>. Leur liaison à ces récepteurs peut perturber la liaison des ligands naturels et agir de manière agoniste ou antagoniste. D'autres voies, n'impliquant pas de récepteurs nucléaires, sont également décrites mais restent minoritaires. De manière générale, la liaison d'un ligand naturel sur son récepteur induit l'activation de celui-ci. Les ligands naturels ainsi que les molécules mimant les ligands naturels sont des agonistes du récepteur. En revanche, certains ligands, dits antagonistes peuvent induire une inhibition du récepteur. Les récepteurs nucléaires peuvent donc être activés ou inactivés par des molécules autres que leurs ligands naturels, telles que des molécules endogènes de type hormones ou exogènes de type principes actifs de médicaments et polluants chimiques. Parmi les récepteurs nucléaires les plus sensibles aux perturbateurs endocriniens, se trouvent les récepteurs aux œstrogènes (Ers), les récepteurs aux androgènes (Ars), ou encore les récepteurs contrôlant l'activation de la prolifération des peroxysomes (PPARs)<sup>87,88</sup>. Ces derniers, essentiels au développement placentaire, sont détaillés par la suite.

## E. Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$

Les récepteurs nucléaires sont une superfamille de protéines qui régulent la transcription des gènes et les fonctions intracellulaires <sup>89</sup>. Cette famille inclue notamment les récepteurs des hormones stéroïdiennes Ers et ARs, des hormones thyroïdiennes (TRs), de la vitamine D (VDRs), des stérols (LXRs), des rétinoïdes (RXRs) et des proliférateurs de peroxysomes PPARs. Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription activés par des ligands qui régulent diverses fonctions biologiques telles que la différenciation et le développement cellulaire, le métabolisme lipidique et l'homéostasie énergétique. Parmi les ligands de cette superfamille on retrouve, par exemple, les stéroïdes, les acides gras, les hormones et les vitamines A et D.

### 1. La famille des PPARs et leurs ligands

Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils agissent comme facteurs de transcription, notamment des gènes régulant le métabolisme lipidique, le métabolisme du glucose et la différenciation cellulaire.

#### 1.1. Les différentes isoformes PPARs

En 1990, le premier PPAR a été isolé par Issemann *et al.* <sup>90</sup>. Depuis, de nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre le mécanisme d'action ainsi que le rôle de cette famille de récepteurs nucléaires.

Il existe trois isoformes, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$ , qui sont codées par des gènes différents chez l'humain. PPAR $\alpha$  est majoritairement exprimé dans le foie mais également dans les muscles, les reins et le cœur, où il stimule la dégradation des acides gras. PPAR $\gamma$  est surtout exprimé dans les tissus adipeux puisqu'il joue un rôle important dans la différenciation des adipocytes et dans le stockage des lipides. Il est également exprimé dans le foie, le muscle squelettique, le côlon et le placenta <sup>91,92</sup>. PPAR $\beta/\delta$  est, quant à lui, exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme.

Dans le cadre de l'objet de cette thèse, une attention particulière a été portée à PPAR $\gamma$  en raison du rôle important qu'il joue tant dans le développement placentaire que dans le métabolisme lipidique.

## 1.2. Les ligands de PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  présente un grand nombre de ligands naturels tels que des dérivés de l'acide linoléique et arachidonique, des lipides libérés par les LDL oxydées ou encore des acides gras issus du métabolisme enzymatique.

### 1.2.1. Les ligands naturels

Les LDL sont des complexes hydrophiles composés de lipides et de protéines (apolipoprotéines). La particule de LDL est riche en cholestérol et en acides gras polyinsaturés. Les acides gras principalement retrouvés sont l'acide linoléique (C18:2), l'acide arachidonique (C20:4) et l'acide docosahéxaénoïque (C22:6). Les dérivés de ces acides gras, tels que les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) et les acides hydroxyoctadécadiénoïques (HODEs) sont des ligands naturels de PPAR $\gamma$ <sup>93,94</sup>. En 2001, Davies *et al.* ont identifié un autre ligand naturel de PPAR $\gamma$ , également constituant des LDL oxydées. Il s'agit d'un dérivé de phospholipide : l'hexadecyl azelaoyl phosphatidylcholine (azPC)<sup>95</sup>.

PPAR $\gamma$  possède également de nombreux ligands issus du métabolisme enzymatique tels que les acides gras insaturés, saturés et les eicosanoïdes<sup>96,97</sup> (Tableau 2). La classification ainsi que la structure de ces différents lipides seront détaillées plus loin.

Les eicosanoïdes ligands de PPAR $\gamma$  sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique *via* deux voies de synthèses :

- la voie de la cyclo-oxygénase, qui permet la synthèse de prostaglandines et notamment de la prostaglandine J<sub>2</sub> (PGJ<sub>2</sub>) et de la 15-déoxy-prostaglandine J<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>) ;
- la voie de la lipo-oxygénase, qui aboutit à la synthèse de l'acide hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) et du leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>).

D'autres ligands, synthétisés à partir des acides linoléiques (C18:2) et linoléiques (C18:3) par la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase, sont également des ligands de PPAR $\gamma$ . Il s'agit des acides hydroxyoctadécadiénoïques (9-HODE et 13-HODE)<sup>93,94</sup>.

Certains acides gras, tels que l'acide oléique (C18:1) et l'acide palmitique (C16:0), n'ont, en revanche, qu'une faible affinité pour PPAR $\gamma$ <sup>94</sup>.

### 1.2.2. Les ligands synthétiques

PPAR $\gamma$  peut également lier des composés synthétiques de la famille des thiazolidinediones et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Les thiazolidinediones sont utilisées pour leur propriété antidiabétique et regroupent la troglitazone, la pioglitazone, l'englitazone, la

ciglitazone et la rosiglitazone (Tableau 2). Cette dernière présente l'affinité la plus forte pour PPAR $\gamma$  ( $K_d = 40$  nM) et, à l'instar des ligands naturels, se comporte comme un agoniste de ce récepteur <sup>98,99</sup>.

Parmi les AINS, l'indométacine, l'acide flufénamique, le fénoprofène et l'isoprofène sont également des ligands agonistes de PPAR $\gamma$  <sup>100</sup>.

### 1.2.3. Les ligands non naturels

En 1999, Maloney *et al.* ont mené une étude sur l'activation de PPAR $\alpha$  et de PPAR $\gamma$  par différents polluants chimiques chez les rongeurs. Parmi les contaminants, ils ont étudié l'effet du trichloroéthylène (TCE), de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) et du di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP). Les résultats ont montré que les métabolites de ces trois molécules exercent un effet sur les PPARs et notamment que le mono(2-éthylhexyl)phtalate (MEHP), métabolite du DEHP, se lie à PPAR $\gamma$  et active ce dernier <sup>101,102</sup>. En 2003, Hurst *et al.* ont démontré l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP, chez le rat et chez l'humain <sup>103</sup>.

Ces études ont permis d'identifier un grand nombre de ligands, naturels ou non, de PPAR $\gamma$ . Les récepteurs nucléaires sont, en général, activés par un faible nombre de ligands. En effet, le plus souvent, seulement quelques ligands sont spécifiques d'un récepteur nucléaire. Dans le cas de PPAR $\gamma$ , il a été démontré qu'un grand nombre de ligands, de structures diverses, étaient capables de l'activer. Des études ont donc été menées afin de visualiser la structure du domaine de fixation du ligand (LBD) de PPAR $\gamma$  permettant ainsi de comprendre les interactions des ligands avec ce récepteur nucléaire.

Les résultats ont montré que, dans le cas des ligands de la famille des thiazolidinediones, la fonction carbonyle forme deux liaisons hydrogènes avec des résidus histidine du LBD. D'autres liaisons hydrogènes, dites secondaires, sont également formées, menant ainsi à une conformation stable entre le ligand et les acides aminés participants <sup>104</sup>. La plupart des ligands de PPAR $\gamma$  ne possèdent pas cette fonction carbonyle, or ils se lient tout de même au récepteur. Les études ont alors démontré que la fonction acide carboxylique de ces ligands joue un rôle similaire au niveau du LBD. En effet, des liaisons hydrogènes se forment entre le carboxylate du ligand et les résidus histidine du LBD <sup>105-107</sup>. La grande majorité des ligands décrits ci-avant possèdent effectivement une fonction acide carboxylique, ce qui peut expliquer, en partie, leur interaction avec PPAR $\gamma$ . (Tableau 2). De plus, le site de liaison des PPARs, et notamment de PPAR $\gamma$ , apparaît relativement grand en comparaison de celui des autres récepteurs nucléaires <sup>108-110</sup>. Cette différence permettrait ainsi à PPAR $\gamma$  d'interagir avec une large gamme de ligands.

Les différentes études menées ont permis de mettre en exergue un certain nombre de ligands de PPAR $\gamma$ , naturels ou non, et potentiellement toxiques. Ainsi, le MEHP en tant que métabolite du DEHP, est classé perturbateur endocrinien avéré et la question d'un effet toxique potentiel de ce métabolite, *via* son interaction avec PPAR $\gamma$  est posée.

Tableau 2 : Les différents ligands de PPAR $\gamma$

	Nom	Structure
Ligands naturels	15-HETE	
	9-HODE	
	PGJ <sub>2</sub>	
	15dPGJ <sub>2</sub>	
	LTB <sub>4</sub>	
	azPC	
Ligands synthétiques	Rosiglitazone	
	Indométacine	
Ligand non naturel	MEHP	

### 1.3. Le mécanisme d'action de PPAR $\gamma$

Les PPARs, à l'instar des autres récepteurs nucléaires, possèdent une structure modulable composée de différents domaines fonctionnels. Le domaine de fixation de l'ADN (DBD), ainsi que le domaine de fixation du ligand LBD, sont les régions les mieux conservées entre les différentes isoformes de PPAR. Le DBD est constitué de deux structures en doigt de zinc qui interagissent spécifiquement avec les éléments de réponse PPREs. Le LBD, localisé dans la région C-terminale du récepteur, est composé d'un feuillet  $\beta$  et de 12 hélices  $\alpha$  (H<sub>1</sub>-H<sub>12</sub>)<sup>109</sup>.

Outre son rôle dans la spécificité de liaison au ligand, il participe également à la régulation de la transcription ligand-dépendante <sup>108</sup>.

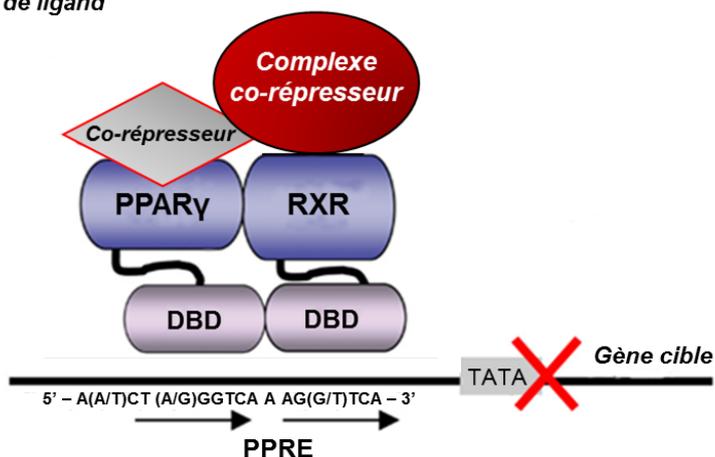
L'activation de la transcription dépend de deux facteurs : l'activation de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR par leurs ligands spécifiques et l'interaction de cet hétérodimère avec son élément de réponse. En effet, à la différence des récepteurs aux hormones stéroïdiennes fonctionnant en homodimères, les PPARs forment un hétérodimère avec le récepteur des rétinoïdes RXR. À l'instar des PPARs, RXR existe sous forme de trois isoformes distinctes : RXR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . En revanche, un seul ligand a été identifié comme agoniste endogène des RXR, l'acide 9Z-rétinoïque <sup>7,108</sup>.

Les PPARs modulent, donc, l'expression des gènes cibles en se liant, sous forme d'hétérodimère, à leurs PPREs. L'activation de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR, par leurs ligands, induit sa liaison à l'élément de réponse. Ce complexe peut être activé par les ligands spécifiques de l'un ou de l'autre récepteur. En effet, l'activation du dimère ne nécessite pas la fixation de deux ligands respectifs de PPAR $\gamma$  et RXR ; une seule interaction ligand-récepteur est suffisante. De plus, la combinaison de ligands entraîne un effet additif, voire synergique <sup>7,111</sup>.

En l'absence de ligands, l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR est inactif. Il forme un complexe avec des co-répresseurs, empêchant l'activation de la transcription des gènes. La fixation des ligands de PPAR $\gamma$ /RXR induit une dissociation des co-répresseurs et une activation du dimère, permettant alors à celui-ci de se fixer sur PPRE. Par la suite, des co-activateurs sont recrutés par les récepteurs nucléaires activés, stimulant ainsi la transcription <sup>112-114</sup> (Figure 6).

L'activation du complexe PPAR $\gamma$ /RXR, par leurs ligands, induit donc la transcription de nombreux gènes impliqués, notamment, dans la différenciation cellulaire, le métabolisme lipidique ou l'homéostasie énergétique. PPAR $\gamma$  étant exprimé au niveau du placenta, il apparaît alors intéressant d'étudier son rôle et ses fonctions dans le développement de cet organe.

En l'absence de ligand



En présence de ligand

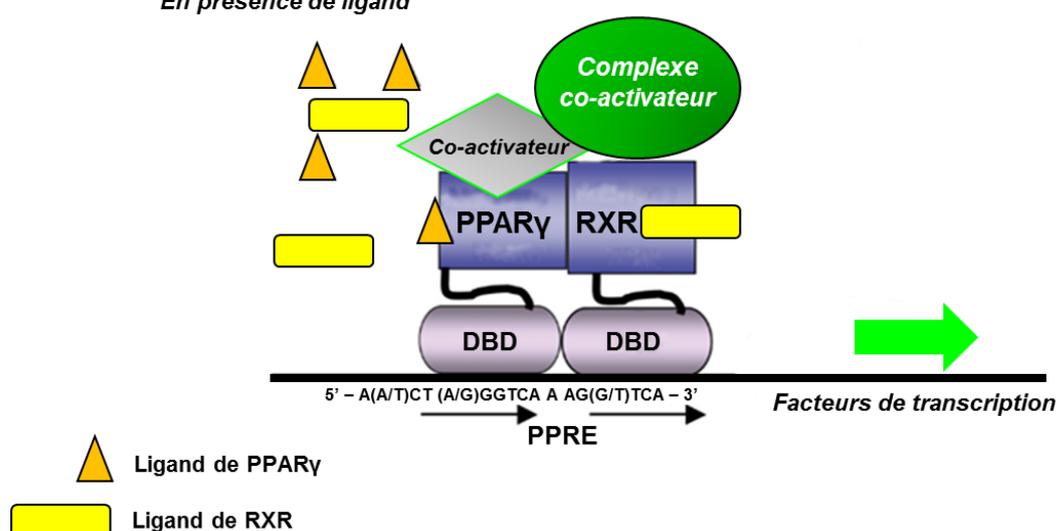


Figure 6 : Régulation de la transcription par l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR (d'après <sup>114</sup>)

## 2. PPAR $\gamma$ et le placenta humain

Parmi les différentes isoformes PPARs, PPAR $\gamma$  est le premier à avoir été retrouvé au niveau du placenta. Il a, dans un premier temps, été identifié dans la lignée cellulaire JEG-3 <sup>115</sup>.

Dans le placenta humain, PPAR $\gamma$  est exprimé, principalement, dans les trophoblastes <sup>91</sup>. Au cours du premier trimestre, il est essentiellement détecté dans les cytotrophoblastes vilieux. Durant le second trimestre de grossesse, PPAR $\gamma$  est retrouvé au niveau des villosités crampons, notamment dans les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs et invasifs. Il est également présent dans les cytotrophoblastes extravilleux endovasculaires de la plaque basale maternelle <sup>116</sup>. Au troisième trimestre de grossesse, PPAR $\gamma$  est détecté aussi bien dans les syncytiotrophoblastes que dans les cytotrophoblastes vilieux et extravilleux. Ainsi, PPAR $\gamma$  peut être considéré comme marqueur du trophoblaste <sup>114,116</sup>.

### 2.1. Rôle de PPAR $\gamma$ dans le placenta humain

L'effet d'une déficience de PPAR $\gamma$  ne pouvant être étudié chez l'Homme, son implication dans le développement des fonctions placentaires a été analysée chez la souris. Des études ont montré que l'annulation du récepteur nucléaire est létale au cours de la gestation pour plus de 90 % des embryons murins <sup>117,118</sup>. Le développement du placenta est alors incomplet, caractérisé notamment par un défaut de différenciation des trophoblastes et des anomalies de vascularisation. De même, l'annulation de RXR, partenaire de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR, conduit à une mortalité embryonnaire et à des malformations placentaires <sup>119</sup>. Ces résultats soulignent le rôle important de PPAR $\gamma$  dans le développement du placenta murin.

Les études réalisées chez la souris ainsi que les données recueillies chez l'Homme, notamment le fort niveau d'expression de PPAR $\gamma$  dans les trophoblastes, suggèrent un rôle primordial de celui-ci dans la différenciation et la fonction des trophoblastes.

Chez l'humain, le début de la grossesse est caractérisé par une invasion des trophoblastes dans l'endomètre utérin. Ce processus est essentiel pour l'accès du placenta à la circulation maternelle et par l'établissement des échanges fœto-maternels. La régulation de cette fonction d'invasion trophoblastique, par PPAR $\gamma$ /RXR, a été mise en évidence par des essais *in vitro* sur matrices extracellulaires (Matrigel). Les études ont ainsi montré que les ligands de PPAR $\gamma$  modulent la différenciation des trophoblastes. En effet, les ligands agonistes de PPAR $\gamma$  tels que la rosiglitazone, favorisent la fusion des cytotrophoblastes et inhibent leur invasion <sup>91,114</sup>. À l'inverse, l'invasion des trophoblastes est favorisée par des antagonistes de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR <sup>120</sup>. Ainsi, PPAR $\gamma$  semble-t-il jouer un rôle prépondérant dans la formation du syncytium ainsi que dans l'invasion trophoblastique, et donc dans le développement précoce du placenta.

### 2.2. Rôle de PPAR $\gamma$ dans le métabolisme lipidique placentaire

Outre son rôle dans la différenciation trophoblastique et le développement précoce du placenta, PPAR $\gamma$  régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Or, une forte activité de synthèse et de transport lipidique a lieu au niveau du placenta, suggérant, ainsi, un potentiel rôle de PPAR $\gamma$  dans le métabolisme lipidique placentaire.

#### 2.2.1. Les ligands potentiels de PPAR $\gamma$ dans le placenta humain

Les principaux lipides incorporés par le placenta sont les acides gras libres, les phospholipides, les triacylglycérols, les glycolipides, les sphingolipides, le cholestérol, les

esters de cholestéryl et les vitamines liposolubles. Les acides gras essentiels ainsi que leurs dérivés, les acides gras polyinsaturés à longues chaînes, sont indispensables à la croissance et au développement fœtal. Les acides gras du placenta humain peuvent provenir de différentes sources : de la circulation maternelle, de l'internalisation de lipoprotéines de type lipoprotéines de très faible densité VLDL ou de l'hydrolyse, par des lipases placentaires, des triacylglycérols présents dans les lipoprotéines (Figure 7) <sup>121</sup>. Les acides gras peuvent traverser la membrane des trophoblastes par simple diffusion. Cependant, la plupart pénètrent dans le syncytiotrophoblaste grâce à l'action de diverses protéines de liaison et de transport <sup>122</sup>. Ces acides gras, présents dans la cellule, sont une source de ligands considérable de PPAR $\gamma$ . Les transporteurs, tels que les protéines de liaison des acide gras FABP, les protéines de transport FATP et les translocases FAT/CD36 sont situées au niveau de la membrane microvillositaire et de la membrane basale (Figure 7). Elles permettent, dans un premier temps, l'internalisation des acides gras dans la cellule, puis, dans un second temps, leur distribution au fœtus. L'expression de ces protéines est régulée par PPAR $\gamma$  <sup>123</sup>. Ainsi, les ligands de PPAR $\gamma$  favorisent l'accumulation d'acide gras dans le placenta et, de ce fait, fournissent des ligands potentiels du récepteur <sup>10,124</sup>.

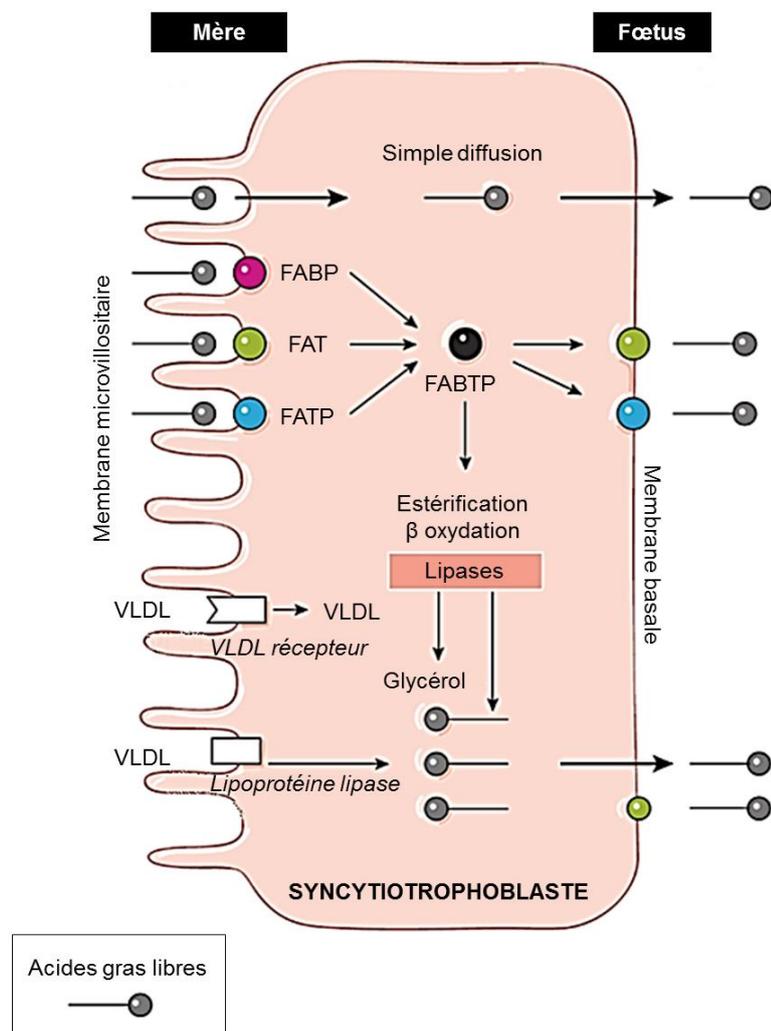


Figure 7 : Transfert des acides gras dans le placenta humain (d'après <sup>10</sup>)

Les acides gras peuvent provenir du sang maternel et/ou de la dégradation des triacylglycérols contenus dans les VLDL par les lipoprotéines lipases placentaires. Ces acides gras peuvent pénétrer la cellule par diffusion passive ou à l'aide de différents transporteurs : FABP, FAT, FATP. Ils sont ensuite orientés vers les sites d'estérification et de  $\beta$  oxydation grâce à leur interaction avec des protéines de transport spécifiques FABTP. Des transporteurs sont également présents au niveau de la membrane basale, permettant le passage des acides gras dans la circulation foetale.

La synthèse *de novo* de dérivés de l'acide arachidonique a également lieu au niveau du placenta humain. De fait, de nombreuses enzymes, nécessaires à la production d'eicosanoïdes, ont été identifiées dans le placenta. Les cyclo-oxygénases sont présentes de manière ubiquitaire, tandis que les lipo-oxygénases et prostaglandines H synthases sont retrouvées au niveau des cytotrophoblastes villosités <sup>125</sup>. La prostaglandine D synthase, enzyme responsable de la synthèse de la 15dPGJ<sub>2</sub>, a également été détectée dans le placenta humain <sup>126</sup>. Ainsi, de nombreux eicosanoïdes sont produits, tels que des prostaglandines, des leucotriènes et des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) (*cf* Les ligands de PPAR $\gamma$ ).

Le passage des acides gras et la synthèse d'eicosanoïdes au niveau des trophoblastes constituent, donc, un apport considérable de ligands agonistes de PPAR $\gamma$ .

### 2.2.2. Les gènes cibles de PPAR $\gamma$ dans le placenta humain

La présence au niveau du placenta de ligands lipidiques induit l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  qui, à son tour, régule la transcription d'un certain nombre de gènes (Figure 8). Des études transcriptomiques ont montré que ces gènes régulent diverses fonctions cellulaires, notamment le métabolisme lipidique. En effet, les gènes transcrits par l'activation de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR sont impliqués dans le transport et l'oxydation des acides gras, le métabolisme du cholestérol et dans la lipogénèse <sup>127-129</sup>.

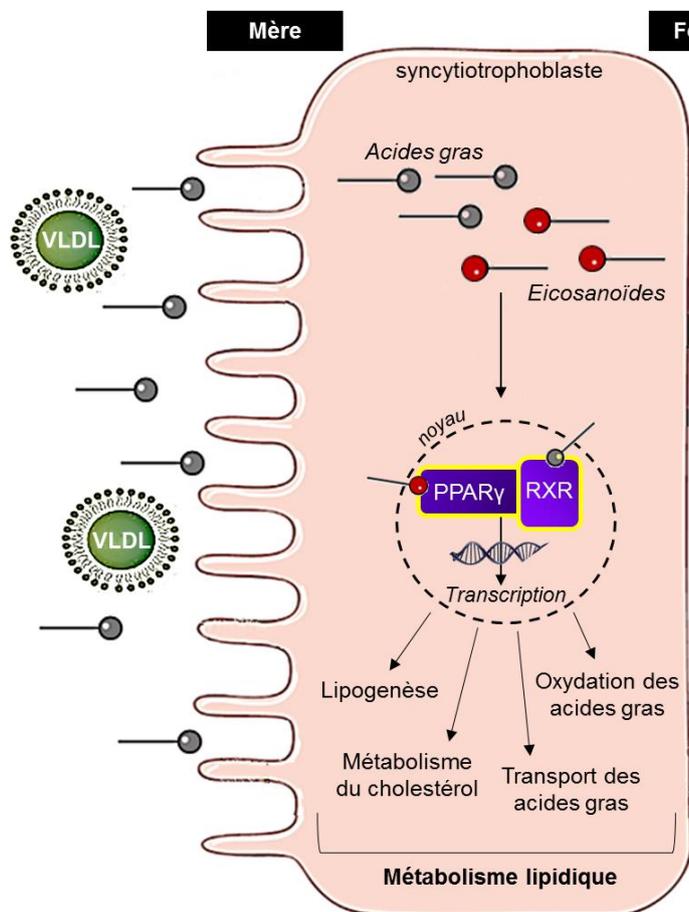


Figure 8 : Régulation du métabolisme lipidique via l'activation de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR par leurs ligands respectifs (d'après <sup>130,131</sup>)

Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  a donc un rôle essentiel dans le développement précoce du placenta et du fœtus. Il est nécessaire à la différenciation des trophoblastes en syncytiotrophoblastes et en cytotrophoblastes extravilloux. Ces derniers, de par leur caractère invasif, permettent le contact entre le fœtus et le sang maternel. Les syncytiotrophoblastes,

quant à eux, sont un lieu d'échanges foëto-maternels. En effet, les acides gras essentiels, apportés par la mère, sont transportés jusqu'au foetus par des protéines de transport situées dans la membrane du syncytiotrophoblaste. De plus, ces cellules sont le siège d'une forte activité de synthèse lipidique, notamment d'eicosanoïdes. Le syncytiotrophoblaste fournit, ainsi, une quantité considérable de ligands de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR. Une fois activé, ce dimère régule la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique placentaire.

Comme nous l'avons vu précédemment, PPAR $\gamma$  peut être activé par des ligands exogènes tels que le MEHP. Il semble alors intéressant d'étudier l'effet potentiel de cette molécule sur l'activité de PPAR $\gamma$  au niveau placentaire. En effet, une modulation de l'activité du récepteur nucléaire pourrait entraîner des perturbations dans la différenciation trophoblastique et/ou du métabolisme lipidique. Ces complications pourraient, alors, conduire à un développement anormal du placenta, voire même à des pathologies placentaires telles que la prééclampsie.

## II. Les phtalates

Les phtalates constituent un groupe de produits chimiques dérivés de l'acide phtalique (Figure 9). Ils sont constitués d'un noyau benzénique comportant deux groupements carboxylates en positions *ortho*, estérifiés par des chaînes alkyles de longueur variable.

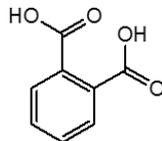


Figure 9 : Structure de l'acide phtalique

Les phtalates sont couramment utilisés dans l'industrie en tant que plastifiants. Ils sont ajoutés dans les matières en polychlorure de vinyle (PVC), afin de leur conférer la souplesse et la flexibilité désirée. Les phtalates sont produits en grandes quantités et sont présents de manière ubiquitaire dans notre environnement quotidien et dans de très nombreux produits à usage domestique : cosmétiques, jouets, emballages alimentaires, peintures, aérosols ou encore dispositifs médicaux. Certains phtalates sont classés comme perturbateurs endocriniens avérés et/ou présumés toxiques pour la reproduction humaine. L'omniprésence de ces molécules dans les produits de consommation ainsi que leurs effets potentiels sur le système reproducteur humain ont suscité l'intérêt de nombreux organismes de santé publique. Ces derniers s'emploient aujourd'hui à mesurer les effets toxiques des phtalates sur l'être humain et son environnement.

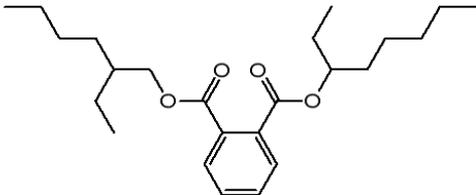
## A. Le DEHP

En raison de ses caractéristiques physiques et son faible coût, le di(2-éthylhexyl)phtalate est le phtalate le plus couramment utilisé dans l'industrie chimique, notamment dans la conception de dispositifs médicaux. Il représente près de la moitié de la production annuelle de phtalates aux États-Unis et en Europe, soit environ un million de tonnes <sup>132,133</sup>. Les plastiques peuvent contenir jusqu'à 40 % en masse de DEHP. En Europe, 95 % du DEHP produit est utilisé en tant que plastifiant du PVC <sup>134</sup>.

### 1. Définition et utilisations

Le DEHP est un diester dérivé de l'acide phtalique (Tableau 3). Il est incorporé au PVC par voie thermique, afin de former le PVC plastifié, plus souple. Il n'est pas lié de manière covalente au plastique, par conséquent, il peut facilement migrer hors du polymère et être libéré dans l'environnement. Le DEHP étant hydrophobe ( $\log P = 7,4$ ) et donc très peu soluble dans l'eau, il diffuse facilement dans les aliments riches en graisses mais aussi dans le sang <sup>135</sup>.

Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques du DEHP (d'après <sup>136</sup>)

DEHP	
Structure chimique	
Masse moléculaire	390,5561 g/mol
Solubilité dans l'eau	Quasi insoluble 0,27 mg/L, à 25 °C
Coefficient de partage octanol/eau (logP)	7,6
Volatilité (Pression de vapeur)	Très peu volatil $4,53 \cdot 10^{-5}$ Pa, à 25 °C

## 2. Voies d'expositions

L'exposition au DEHP peut se faire par voies orale ou digestive, percutanée, respiratoire et intraveineuse.

### 2.1. *La voie orale*

En raison de l'omniprésence du DEHP dans les emballages alimentaires et sa diffusion importante dans les aliments, sa principale voie d'exposition est la voie digestive. Cette exposition est d'autant plus forte dans le cas d'ingestion de produits gras tels que les produits laitiers, la viande et les plats en sauce <sup>137,138</sup>. De plus, la présence de DEHP dans les jouets en plastique accroît l'exposition des jeunes enfants. En effet, ces derniers ayant le réflexe de porter les jouets et objets à la bouche, leur exposition est supérieure à celle des adultes, les rendant ainsi, plus vulnérables <sup>139</sup>. L'exposition des enfants de moins de 3 ans est estimée 3 à 5 fois supérieure à celle des adultes, soit environ 6 à 10 µg/kg/j <sup>140</sup>.

### 2.2. *La voie percutanée*

Une autre voie d'exposition au DEHP est la voie percutanée. Effectivement, ce phtalate est présent dans un grand nombre de produits cosmétiques tels que les vernis à ongles, les déodorants, les gels et les lubrifiants. Le contact cutané direct permet le passage du DEHP dans l'organisme. Alors que la pénétration cutanée du DEHP ait été jusqu'il y a peu considérée comme faible, des études *in vitro* effectuées par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) publiées en 2014, ont montré que, chez l'homme, le DEHP pénètre rapidement à travers la peau lorsqu'il est émulsifié dans une phase aqueuse <sup>141</sup>. L'exposition cutanée ne doit donc pas être négligée, bien qu'il s'agisse d'une voie secondaire en comparaison avec la voie digestive.

### 2.3. *La voie respiratoire*

Une troisième voie d'exposition doit aussi être prise en compte : la voie respiratoire. Cependant, en raison de la très faible volatilité du DEHP cette voie d'exposition est minoritaire. L'inhalation peut tout de même se faire par l'utilisation de parfums, peintures et aérosols. Cette voie sera principalement prise en compte dans le cas d'une exposition professionnelle, *i.e.* régulière et à long terme <sup>142</sup>.

## 2.4. La voie intraveineuse

La dernière voie d'exposition, non négligeable et à ce titre devant être considérée, est la voie intraveineuse. En effet, les différents dispositifs médicaux en matière plastique sont une source importante de DEHP. Ces dispositifs, notamment les poches de transfusion et de perfusion, les seringues jetables et les cathéters, étant en PVC souple, contiennent une grande quantité de DEHP. Celui-ci peut donc être facilement transféré dans le sang <sup>143,144</sup>. En 1970, Jaeger *et al.* ont révélé la présence de DEHP dans le sang humain ayant été stocké dans des poches en PVC <sup>145</sup>. Par la suite, ce phtalate a été détecté dans les poumons, le foie et la rate de patients ayant subi une transfusion sanguine <sup>146</sup>. Les lipoprotéines contenues dans le sang seraient à l'origine de l'extraction du DEHP du plastique. En 1973, Marcel *et al.* ont montré qu'il existe une corrélation entre la quantité de DEHP, relargué à partir d'une poche de transfusion, et la concentration plasmatique en triacylglycérols <sup>147</sup>.

Les personnes les plus à risque, face à cette exposition, sont les déficients rénaux régulièrement dialysés, les patients en hospitalisation longue en contact avec des poches de sang, de perfusion ou des sondes intraveineuses et les femmes enceintes hospitalisées. Chez la femme enceinte, l'exposition au DEHP est d'autant plus préoccupante qu'elle touche à la fois la mère et le fœtus suite au passage du phtalate au travers de la barrière placentaire. Les nouveau-nés hospitalisés sont également particulièrement exposés en raison de la quantité élevée de DEHP relargué par les dispositifs médicaux par rapport à leur poids <sup>148-150</sup>. En 2008, le Bureau Européen des produits Chimiques (ECB) a estimé que l'exposition au DEHP des adultes hémodialysés pouvait atteindre 3 000 µg/kg/j et celle des nouveau-nés 1 700 µg/kg/j, soit 200 à 1 000 fois la dose de référence <sup>140</sup>.

L'utilisation très répandue du DEHP dans les emballages plastiques et leur capacité au relargage font de ce phtalate un contaminant ubiquitaire, auquel l'Homme est régulièrement exposé. De nombreuses études ont montré que la majorité des populations absorbent du DEHP dont les métabolites sont excrétés par voie urinaire à des concentrations non négligeables.

## 3. Métabolisme

Une fois dans l'organisme, le DEHP est rapidement hydrolysé en monoester, le MEHP, par des lipases pancréatiques. Dans un second temps, la chaîne alkyle restante peut être modifiée par diverses réactions d'oxydation et d'hydroxylation (Figure 10). Enfin, le MEHP ainsi que ses métabolites d'oxydation, peuvent être conjugués à l'acide glucuronique pour être finalement excrétés dans les urines et les fèces <sup>150,151</sup>. De ce fait, la concentration en diester,

mesurée dans le sang, est être très faible et, inversement, celle en monoester et monoester oxydé plus élevée <sup>152,153</sup>. Le MEHP et ses métabolites oxydés sont, d'ailleurs, régulièrement dosés dans les urines en tant que biomarqueurs d'exposition au DEHP <sup>154,155</sup>. Chez le nouveau-né et le jeune enfant, la voie de glucuroconjugaison n'étant pas encore mature, le mécanisme d'élimination des phtalates n'est pas totalement fonctionnel. L'exposition à ces derniers est alors prolongée <sup>156,157</sup>.

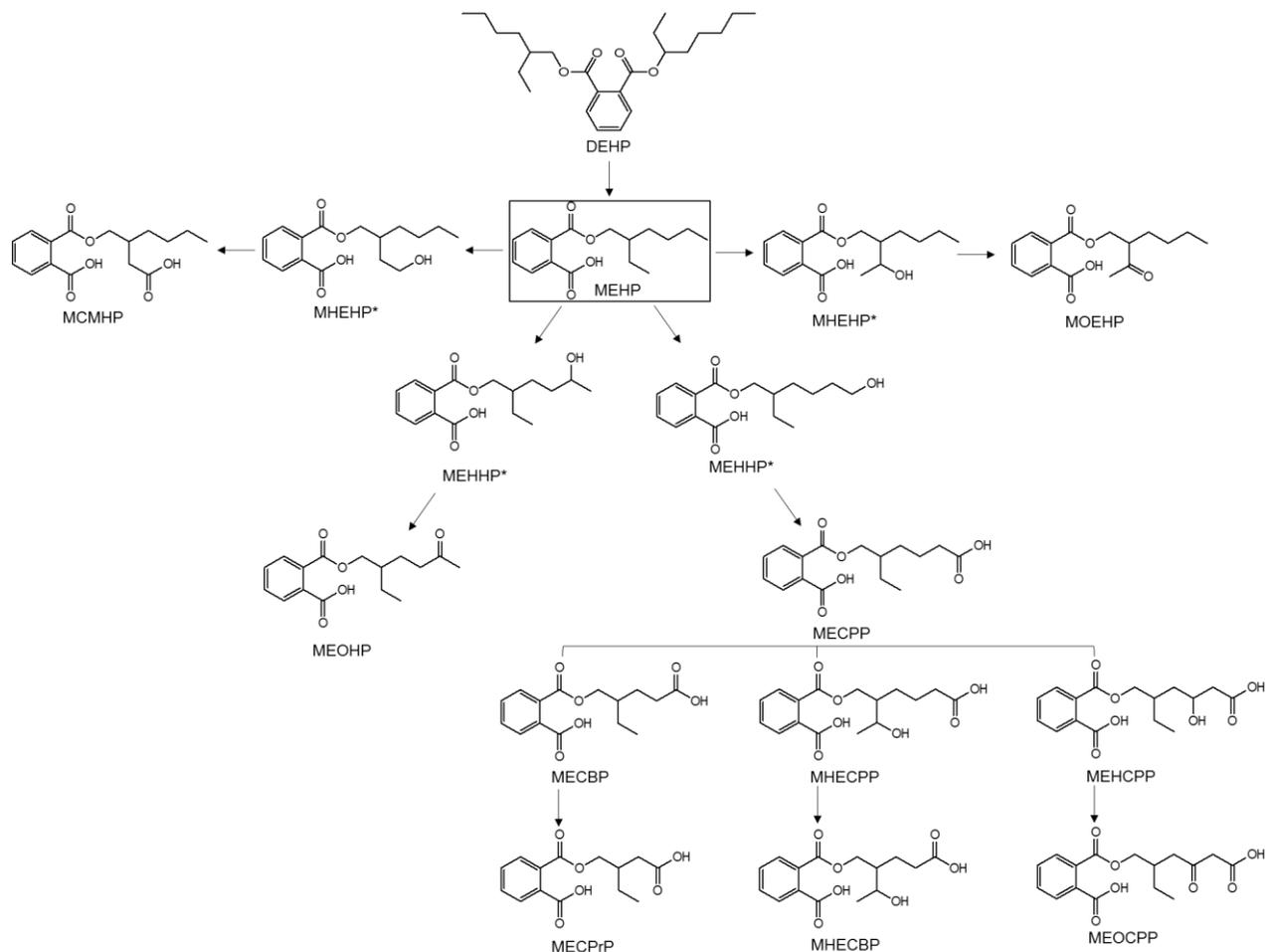


Figure 10 : Métabolisation du DEHP (d'après <sup>151</sup>)

(\*) Isomères structuraux ; DEHP : di(2-éthylhexyl)phtalate, MEHP : mono(2-éthylhexyl)phtalate, MHEHP : mono-2-(1-hydroxyéthyl)hexyl phtalate, MOEHP : mono-2-(1-oxéthyl)hexyl phtalate, MEHHP : mono(2-éthyl-hydroxyhexyl)phtalate, MEOHP : mono(2-éthyl-oxohexyl)phtalate, MCMHP : mono(2-carboxyméthyl)hexyl phtalate, MECPP : mono(2-éthyl-carboxypentyl)phtalate, MECBP : mono(2-éthyl-carboxybutyl)phtalate, MECPrP : mono(2-éthyl-carboxypropyl)phtalate, MEHCPP : mono(2-éthyl-hydroxy-carboxypentyl)phtalate, MEOCPP : mono(2-éthyl-oxo-carboxypentyl)phtalate

Une fois absorbé, le DEHP et ses métabolites sont distribués dans tous les tissus. Les concentrations les plus élevées en DEHP sont toutefois mesurées au niveau du foie et des reins.

L'exposition maternelle aux phtalates constitue la principale source d'exposition fœtale. En effet, des études ont décrit le passage de ces molécules à travers la barrière placentaire. Ces

phtalates sont retrouvés au niveau du cordon ombilical, du liquide séminal paternel et du liquide amniotique, suggérant ainsi une exposition *in utero* <sup>158-160</sup>. De plus, la présence de DEHP a également été retrouvée dans le lait maternel, exposant ainsi le nouveau-né lors de l'allaitement <sup>161</sup>.

#### 4. Effets connus

Les premières études démontrant la toxicité des phtalates, chez le rat et la souris, ont été publiées dans les années 40. Les effets délétères de ces molécules, notamment du DEHP, ont depuis été mis en évidence chez le rat, puis chez l'Homme.

##### 4.1. Effets chez le rat

Chez le rat, suite à l'ingestion de doses répétées de DEHP, de nombreux effets délétères ont été observés : cardiotoxicité, néphrotoxicité et hépatotoxicité, en particulier une prolifération des peroxyosomes et le développement de cancers du foie. Cependant, la toxicité la plus importante concerne les altérations de l'appareil reproducteur mâle et femelle. Les effets suivants ont été rapportés : atrophies testiculaires et des glandes reproductrices mâles, hypospadias (ouverture de l'urètre dans la face inférieure du pénis), cryptorchidie (absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum), non régression des mamelons, réduction de la distance ano-génitale, diminution de la production de sperme, ouverture vaginale, mortalité foétale, poids foetaux réduits et baisse de fertilité <sup>162-165</sup>. Chez le mâle, ces effets sont précédés d'une dérégulation des fonctions des cellules de Leydig, se traduisant par une diminution de la production de testostérone <sup>166</sup>. Ainsi, les effets observés chez le rat sont à caractère anti-androgénique.

##### 4.2. Effets chez l'Homme

Chez l'homme, peu d'études ont été publiées concernant le lien entre exposition aux phtalates et altération du système reproducteur. Cependant, certains effets ont, tout de même, été mis en évidence. Des études ont suggéré une association probable entre une exposition aux phtalates et une dérégulation dans la production de sperme (diminution de la motilité et de la concentration, malformations) <sup>167,168</sup>. En 2009, Lambrot *et al.* ont montré *in vitro*, sur un modèle de développement du testicule, une diminution de 40 % des cellules germinales foétales induite par la présence de DEHP. <sup>169</sup> Une autre étude a permis de mettre en évidence la diminution de la concentration plasmatique de testostérone chez des employés exposés au DEHP dans le cadre d'une exposition professionnelle <sup>170</sup>.

Chez la femme, les données sont limitées à quelques études. Deux d'entre elles ont suggéré une relation entre phtalates et endométriose (présence de tissu utérin en dehors de la cavité utérine) avec, notamment, une concentration plasmatique en DEHP accrue chez les femmes présentant une endométriose <sup>171,172</sup>. En 2003, Latini *et al.* ont montré que la concentration en DEHP dans le sang du cordon est associée à une diminution de l'âge gestationnel.

Chez l'enfant, à l'instar des rats, une exposition *in utero* au DEHP entraîne la diminution de la distance ano-génitale <sup>173</sup>. D'autres observations ont été recensées telles qu'une taille de pénis réduite et une descente incomplète des testicules. Le DEHP induit, également, une inflammation intra-utérine, entraînant des naissances prématurées <sup>159,174</sup>.

Face à tous ces effets néfastes recensés chez l'animal et chez l'Homme, une réglementation stricte sur l'utilisation du DEHP, et des phtalates en général, a été mise en place.

## 5. Classification et réglementation

Les différentes données recueillies sur les effets adverses du DEHP, notamment sur le système reproducteur, ont conduit en 2002 la Commission européenne (CE) à classer ce phtalate comme perturbateur endocrinien de catégorie 1, c'est-à-dire avéré.

Le DEHP est également classé reprotoxique de catégorie 2 et de catégorie 1B par l'Union européenne (UE) et la CE, respectivement. Il est considéré comme une « substance suspectée d'être toxique pour la reproduction humaine » (Tableau 4).

D'une manière générale, l'UE a décrété que les données disponibles chez l'animal, concernant la toxicité du DEHP sur la reproduction, sont extrapolables à l'Homme car considérées pertinentes pour celui-ci.

En 2000, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a déclassé le DEHP du groupe 2B au groupe 3. L'organisme a justifié ce choix en indiquant que les cancers du foie observés chez le rat sont induits par un mécanisme de prolifération des peroxysomes propre à chaque espèce. Ce mécanisme n'ayant pas été démontré chez l'Homme, les données ne peuvent être extrapolées.

Tableau 4 : Classifications réglementaires du DEHP (d'après <sup>134</sup>)

<b>DEHP</b>	
CAS	117-81-7
Étiquetage de l'UE	Toxique pour la reproduction, catégorie 2 R60 : peut altérer la fertilité R61 : risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant
Classification de la CE	Toxique pour la reproduction, catégorie 1B H360FD : peut nuire à la fertilité et au fœtus Perturbateur endocrinien avéré, catégorie 1
Classification du CIRC	Cancérogénicité, groupe 3 N'est pas classé comme cancérigène pour l'Homme
Pictogramme	

UE : Union Européenne, CE : Commission Européenne, CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

L'exposition humaine au DEHP et aux autres phtalates est très importante en raison de leur utilisation dans un grand nombre de produits à usage domestique. La multiplicité des sources et voies d'exposition rend difficile l'évaluation de l'exposition réelle à ces molécules chez l'humain. De ce fait, des normes et directives ont été créées et sont régulièrement mises à jour dans le but de limiter l'exposition des populations.

Dans le cadre d'une exposition par voie orale, la directive 2007/19/CE a été adoptée. Celle-ci s'applique aux matériaux et objets en matière plastique destinés à être en contact avec les denrées alimentaires. La directive interdit l'usage du DEHP dans les plastiques destinés à être en contact avec des aliments riches en graisse et impose des limites spécifiques de migration dans les autres emballages alimentaires.

L'exposition cutanée pouvant être associée à l'usage de produits cosmétiques, la présence de DEHP dans ces derniers est encadrée par le règlement n°1223/2009 du Parlement européen. Ce règlement tend à interdire l'utilisation de substances classées cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR de catégorie 1A, 1B et 2) dans les produits cosmétiques. Toutefois, d'après celui-ci ; il « convient de prévoir la possibilité d'autoriser l'utilisation de substances classées comme CMR de catégorie 2 lorsque, au vu de l'exposition et de la concentration, elles ont été considérées comme sûres pour un emploi dans les produits cosmétiques par le CSSC [Comité scientifique européen pour la sécurité des consommateurs]».

Enfin, dans le cadre de l'exposition associée aux dispositifs médicaux, la directive 2007/47/CE impose aux fabricants d'étiqueter spécifiquement les matériaux contenant des phtalates classés CMR de catégorie 1 ou 2, dont le DEHP. Les fabricants doivent, également, justifier l'utilisation de cette molécule, indiquer dans la notice d'information les risques encourus et prendre des précautions particulières dans le cas où les dispositifs médicaux sont à destination d'enfants ou de femmes enceintes. Les phtalates sont également interdits, depuis 2005, dans les jouets de puériculture pouvant être portés à la bouche par les enfants. Enfin, l'article LS214-1 de la loi 2012-1442 interdit, depuis juillet 2015, l'utilisation du DEHP dans les dispositifs médicaux des services de pédiatrie, néonatalogie et maternité.

Depuis les années 1940, de nombreuses études ont recensé l'impact des phtalates, en particulier du DEHP, sur le système reproducteur du rat. Les données recueillies ont mis en évidence le caractère reprotoxique et perturbateur endocrinien du DEHP. Malgré le nombre limité d'études réalisées chez l'Homme, l'UE a décrété que les effets déterminés chez l'animal sont extrapolables à l'humain. Ainsi, le DEHP est-il aujourd'hui considéré comme perturbateur endocrinien avéré chez l'Homme et potentiellement toxique pour la reproduction. Cependant, puisque les effets délétères consécutifs à une exposition au DEHP sont en fait provoqués par son principal métabolite le MEHP, il est admis que c'est ce dernier qui est considéré comme responsable de la toxicité du DEHP. En effet, des études ont montré que les effets du DEHP seraient dus au MEHP. De fait, celui-ci exerce sur les modèles étudiés les mêmes effets reprotoxiques que son précurseur, mais à des concentrations plus faibles <sup>133,175</sup>.

## B. Le MEHP

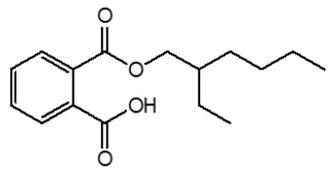
Le MEHP est, aujourd'hui, considéré comme le métabolite responsable de la toxicité du DEHP. Comme nous l'avons vu précédemment (*cf* Les ligands de PPAR $\gamma$ ) le MEHP est un ligand exogène de PPAR $\gamma$ . Il semble alors plausible que les effets toxiques dû au MEHP observés chez l'Homme, notamment chez la femme enceinte, aient pour origine l'activation de PPAR $\gamma$  par ce métabolite du DEHP.

### 1. Propriétés chimiques

Le MEHP est un monoester issu de l'hydrolyse du DEHP, par des lipases majoritairement pancréatiques (Tableau 5). À l'instar de son précurseur diester, le MEHP est très peu soluble dans l'eau. En raison de son caractère hydrophobe et amphiphile, il est préférentiellement

soluble dans les solvants organiques tels que le méthanol ou l'isopropanol. À pH 7, la forme carboxylate est majoritairement présente en solution aqueuse (Figure 11).

Tableau 5 : Propriétés physico-chimiques du MEHP

<b>MEHP</b>	
Structure chimique	
Masse moléculaire	278,3435 g/mol
Solubilité dans l'eau	Quasi insoluble < 1 mg/L, à 25 °C
Coefficient de partage octanol/eau (logP)	4,7
pKa (COOH)	3,08

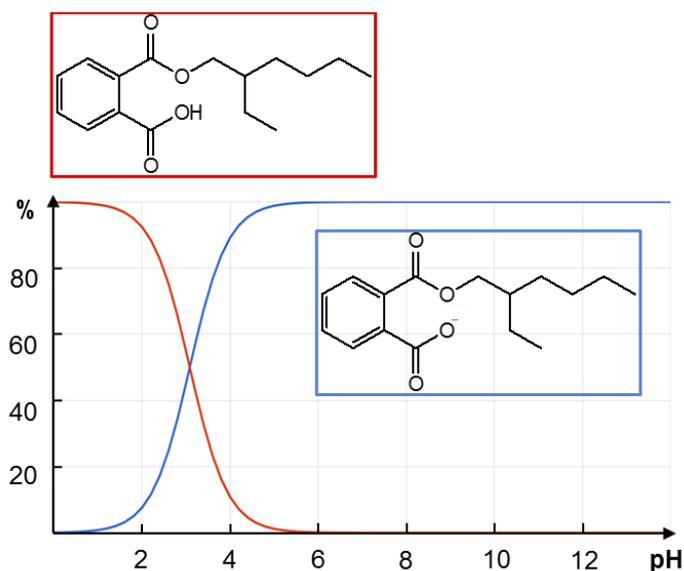


Figure 11 : Diagramme de prédominance des espèces du MEHP en fonction du pH

Les données de sécurité du MEHP, indiquent que celui-ci est un irritant oculaire et cutané de catégorie 2 (phrases H315, H319 et R36/38). Dans la section concernant les informations toxicologiques, aucune donnée n'est disponible. Les fournisseurs concluent que « les propriétés chimiques, physiques et toxicologiques n'ont pas été complètement étudiées »<sup>176</sup>.

## 2. Effets connus

### 2.1. *Effets chez la souris*

En 1980, Yagi *et al.* ont étudié la fœtotoxicité orale du DEHP et du MEHP sur la souris gestante. Les résultats ont montré que le MEHP exerce la même toxicité que le DEHP mais pour des concentrations ingérées plus faibles. Les auteurs ont alors suggéré que la létalité et/ou les effets tératogènes observés sont probablement dus au MEHP <sup>177</sup>. Ces résultats ont été confirmés quelques années plus tard par Tomita *et al.* qui concluent que le MEHP est responsable de la fœtotoxicité observée chez la souris en gestation <sup>175</sup>. Par la suite, de nombreuses études ont décrit la toxicité du MEHP chez les rats et chez l'humain.

### 2.2. *Effets chez l'Homme*

Chez l'Homme, les effets délétères les plus courants concernent le système reproducteur avec, notamment, à l'instar du DEHP, une augmentation du risque de prématurité<sup>159</sup>, une diminution de l'âge gestationnel et un faible poids de naissance <sup>178,179</sup>. Une étude récente de Shi *et al.* a montré que le MEHP, à forte dose, est cytotoxique et affecte le développement de cellules souches embryonnaires. Ces auteurs ont donc conclu que le MEHP induit une toxicité embryonnaire chez l'Homme <sup>180</sup>. En 2012, Muczynski *et al.* ont mis en évidence, pour la première fois, une dérégulation dans la synthèse des lipides, notamment du cholestérol dans les gonades fœtales humaines, suite à une exposition au MEHP <sup>181</sup>. Cette étude met en relation l'activation de récepteurs nucléaires par le MEHP et une perturbation de la lipogenèse.

### 2.3. *Effets sur le lipidome*

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre exposition aux phtalates et perturbation du profil lipidique. Ces études ont montré que l'ingestion répétée de DEHP entraîne une dérégulation du métabolisme lipidique chez le rat et la souris <sup>182,183</sup>. Bien que le mécanisme par lequel le DEHP altère le métabolisme lipidique ne soit pas connu, les auteurs suggèrent l'implication du MEHP. Dans des cultures d'hépatocytes de rats, une incubation en présence de MEHP ( $\leq 1$  mM) entraîne une accumulation de lipides dans les cellules. Cette perturbation du profil lipidique est associée à une augmentation de la synthèse de triacylglycérols <sup>184</sup>. En 2006, Xu *et al.* ont étudié l'effet du MEHP sur le profil lipidique de cellules trophoblastiques de rats. Une accumulation de lipides a ainsi été démontrées, notamment une augmentation d'ester de cholestéryl, de diacylglycérols, de triacylglycérols, d'acides gras et de phospholipides <sup>185</sup>. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que l'altération du profil lipidique des trophoblastes pourrait aboutir à un développement placentaire et/ou fœtal anormal.

Outre le fait qu'il s'agit de perturbateurs endocriniens à l'origine d'effets néfastes sur l'appareil reproducteur humain, un certain nombre d'études ont montré que les phtalates, en particulier le DEHP et le MEHP, sont capables d'altérer le métabolisme lipidique des cellules, notamment des trophoblastes. Comme nous l'avons vu précédemment, au niveau des cellules placentaires, PPAR $\gamma$  régule l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. En effet, l'activation de PPAR $\gamma$  et de PPAR $\beta/\delta$ , chez le rat et la souris, respectivement, entraîne une augmentation significative de certains lipides. Des placentas de souris, nourries au GW501516 (agoniste de PPAR $\beta/\delta$ ) ont montré un changement global de leur composition lipidique, notamment une augmentation du taux d'acides gras, de phospholipides et de stéroïls <sup>186</sup>. En 2008, Capobianco *et al.* ont montré que, dans le placenta de rat, les ligands naturels de PPAR $\gamma$  augmentent la capacité de cet organe à accumuler les lipides provenant de la mère. Ces mêmes ligands diminuent également la synthèse *de novo* de lipides, influant ainsi sur le métabolisme lipidique et le transfert de lipides vers le fœtus <sup>187</sup>. Parmi les ligands de PPAR $\gamma$ , le MEHP a montré une forte affinité pour ce dernier : si de nombreuses études ont prouvé que les trois isoformes de PPAR sont activées par le MEHP, l'affinité la plus forte a été observée pour PPAR $\gamma$  (Kd = 12  $\mu$ M) <sup>101,103,133,188</sup>.

Les différentes études publiées et les résultats décrits, permettent d'émettre l'hypothèse que le MEHP pourrait entraîner une perturbation du profil lipidique des cellules placentaires, *via* l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Figure 12). Les lipides, étant essentiels à de nombreuses fonctions biologiques, un changement dans le profil lipidique des trophoblastes pourrait agir sur le développement du placenta et du fœtus et, ainsi, entraîner des complications de la gestation. Afin de mieux appréhender ces effets potentiels, il est important de connaître les différentes familles de lipides concernés et leurs fonctions biologiques.

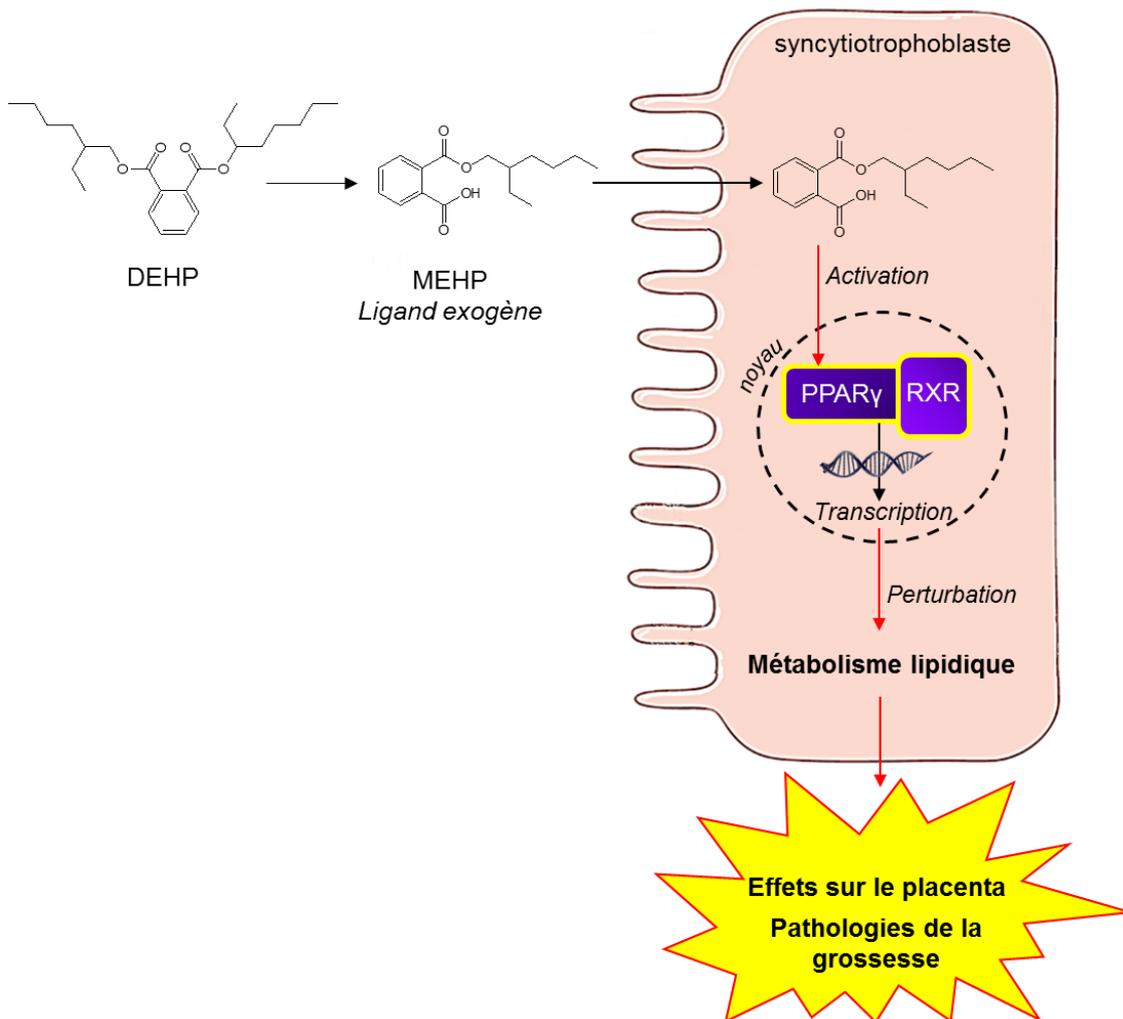


Figure 12 : Mécanisme d'action hypothétique du MEHP et de son implication dans le métabolisme lipidique placentaire

### III. Etude lipidomique

Les lipides jouent un rôle essentiel dans l'organisme. Ils sont impliqués dans un grand nombre de fonctions vitales au sein des cellules. Ainsi est-il intéressant d'étudier les lipides en tant que biomarqueurs de l'altération des fonctions cellulaires.

#### A. Les lipides

Les lipides sont des molécules essentielles à l'organisme. Ils sont retrouvés dans toutes les cellules vivantes, au sein desquelles ils jouent un rôle important d'un point de vue structural et fonctionnel. Les lipides sont impliqués, entre autre, dans la formation des membranes biologiques (plasmique, nucléaire, endoplasmique, etc.), dans le stockage énergétique intracellulaire et dans le processus de signalisation cellulaire.

Les lipides sont de petites molécules (< 1500 Da) dérivant de deux types de composés, dites « briques élémentaires » : les groupes cétoacyles et les unités isoprènes <sup>189</sup> (Figure 13). Ils sont soit hydrophobes, dans le cas de lipides neutres, soit amphiphiles, *i.e.* possédant une tête polaire liée à une chaîne alkyle hydrophobe. D'une manière générale les lipides sont très peu, voire pas, solubles dans l'eau et, à l'inverse, très solubles dans les solvants organiques tels que le méthanol, cyclohexane ou chloroforme.

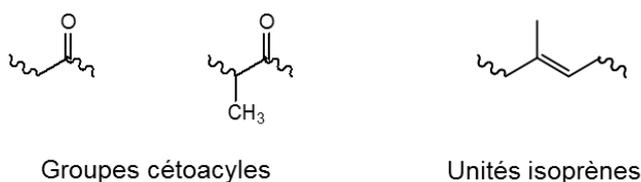
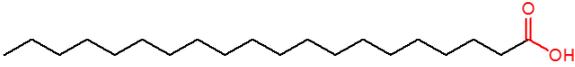
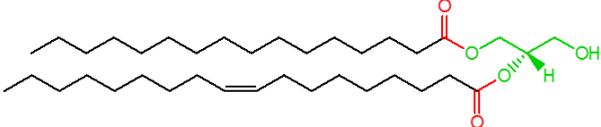
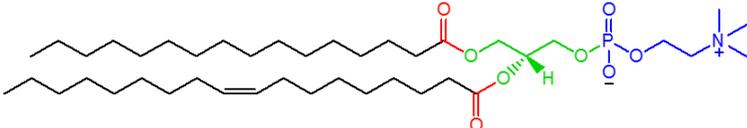
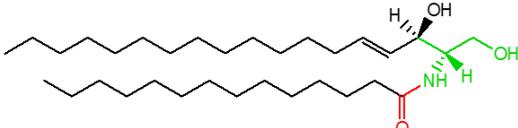
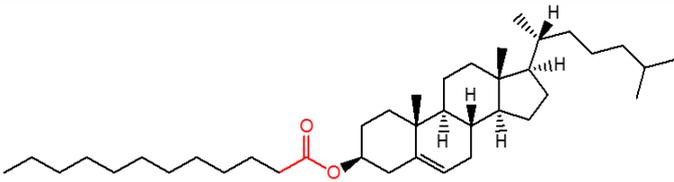
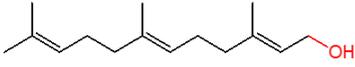
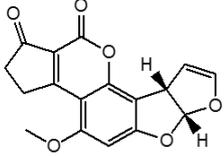
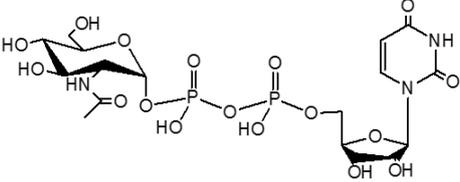


Figure 13 : « Briques élémentaires » caractéristiques des lipides

En raison de leur grande diversité structurale, une classification fondée sur l'origine biosynthétique des lipides a été établie par le *International Lipid Classification and Nomenclature Committee* (ILCNC), sur l'initiative du *LIPID MAPS Consortium*, en 2005. Les lipides sont divisés en huit classes : les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les polycétides, les saccharolipides, qui dérivent tous de la condensation de groupes cétoacyles, ainsi que les prénoles et les stéroïdes, produits à partir d'unités isoprènes (Tableau 6).

Dans le cadre de mes travaux de thèse, mon intérêt se porte, préférentiellement, sur les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stéroïdes.

Tableau 6 : Exemple de structures des huit classes de lipides établies par le LIPID MAPS Consortium

Classe	Structure
Acides gras	
Glycérolipides	
Glycérophospholipides	
Sphingolipides	
Stérols	
Prénols	
Polycétides	
Saccharolipides	

## 1. Les acides gras

Les acides gras constituent une classe fondamentale des lipides biologiques. Ils sont les précurseurs de la majorité des autres lipides, tels que les glycérolipides, les sphingolipides et les esters de cholestéryl<sup>190</sup>. Les acides gras libres et les eicosanoïdes constituent les deux sous-classes principales des acides gras.

### 1.1. Les acides gras libres

Les acides gras libres sont des acides carboxyliques R-COOH, dont le radical R est une chaîne aliphatique hydrocarbonée. Cette chaîne peut être de longueur variable, contenant

généralement de quatre à trente-deux carbones. Elle peut être saturée ou contenir de une à six doubles liaisons au maximum. Les acides gras comportant entre 12 et 20 carbones sont dits à longue chaîne, tandis qu'au-delà de 22 carbones ils sont dits à très longues chaînes <sup>190</sup>. Les acides gras insaturés ont, généralement, une chaîne de 16 à 22 carbones (Tableau 7). Une nomenclature abrégée a été adoptée dans le but de décrire la longueur des chaînes, le nombre d'insaturations et leur positionnement. Cette nomenclature s'écrit sous la forme C<sub>x</sub>:<sub>y</sub>, où x représente le nombre d'atomes de carbone et y le nombre d'insaturations. Par exemple, l'acide palmitique est désigné par C16:0. Lorsque l'acide gras est insaturé, la position des doubles liaisons peut être précisée de deux manières. En accord avec la nomenclature systématique, la chaîne est numérotée en partant du carboxyle et les insaturations sont notées par Δ<sup>a,b</sup>, a et b désignant les positions respectives des doubles liaisons. La nomenclature « biochimique », à l'inverse, numérote la chaîne en partant du méthyle terminal et le numéro du premier carbone possédant l'insaturation est noté « ω- ». Ainsi, en nomenclature abrégée, l'acide linoléique peut être désigné par C18,Δ<sup>9,12</sup>, ou C18:2, ω-6.

Tableau 7 : Principaux acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés

Nom IUPAC	Nom usuel	Nomenclature
<b>Acides gras saturés</b>		
acide butanoïque	acide butyrique	C4:0
acide hexanoïque	acide caproïque	C6:0
acide octanoïque	acide caprylique	C8:0
acide décanoïque	acide caprique	C10:0
acide dodécanoïque	acide laurique	C12:0
acide tétradécanoïque	acide myristique	C14:0
acide hexadécanoïque	acide palmitique	C16:0
acide octodécanoïque	acide stéarique	C18:0
acide eicosanoïque	acide arachidique	C20:0
acide docosanoïque	acide béhénique	C22:0
acide tétracosanoïque	acide lignocérique	C24:0
acide hexacosanoïque	acide cérotique	C26:0
acide octacosanoïque	acide montanique	C28:0
acide triacontanoïque	acide mélissique	C30:0
acide dotriacontanoïque	acide lacéroïque	C32:0
<b>Acides gras monoinsaturés</b>		
acide hexadécénoïque	acide palmitoléique	C16:1, ω-7
acide octadécénoïque	acide oléique	C18:1, ω-9
<b>Acides gras polyinsaturés</b>		
acide octadécadiénoïque	acide linoléique	C18:2, ω-6
acide octadécatriénoïque	acide linoléinique	C18:3, ω-6
acide eicosatriénoïque	acide dihomog-γ-linolénique	C20:3, ω-6
acide eicosatétraénoïque	acide arachidonique	C20:4, ω-6
acide docosahexaénoïque	acide docosahexaénoïque	C22:6, ω-3

Les acides gras présents dans l'organisme sont soit apportés par l'alimentation, soit synthétisés par l'organisme. La biosynthèse des acides gras comporte deux étapes successives. La première consiste en la conversion de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) en malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase. La seconde étape permet la conversion de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA en acide palmitique en présence de NADPH. Cette réaction est catalysée par l'acide gras synthase <sup>191</sup>. L'acide palmitique est, donc, le précurseur des autres acides gras qui sont formés par élongation, désaturation ou  $\beta$ -oxydation de la chaîne aliphatique de ce dernier <sup>192,193</sup>.

### 1.2. Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des lipides oxydés qui dérivent majoritairement de l'acide arachidonique (C20:4) et dont la chaîne aliphatique comporte donc toujours 20 atomes de carbone. Ils sont divisés en trois catégories, en fonction de leur voie de synthèse enzymatique à partir de l'acide arachidonique (Figure 14). La voie de la lipo-oxygénase permet la formation des leucotriènes et des acides hydroxyeicosatétraoïques (HETEs). La voie de la cyclo-oxygénase aboutie à la formation des prostaglandines et des thromboxanes. Enfin, la voie du cytochrome P450 (CYP450) permet la synthèse des HETEs, des acides époxyeicosatriénoïques (EETs) et des acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHETs).

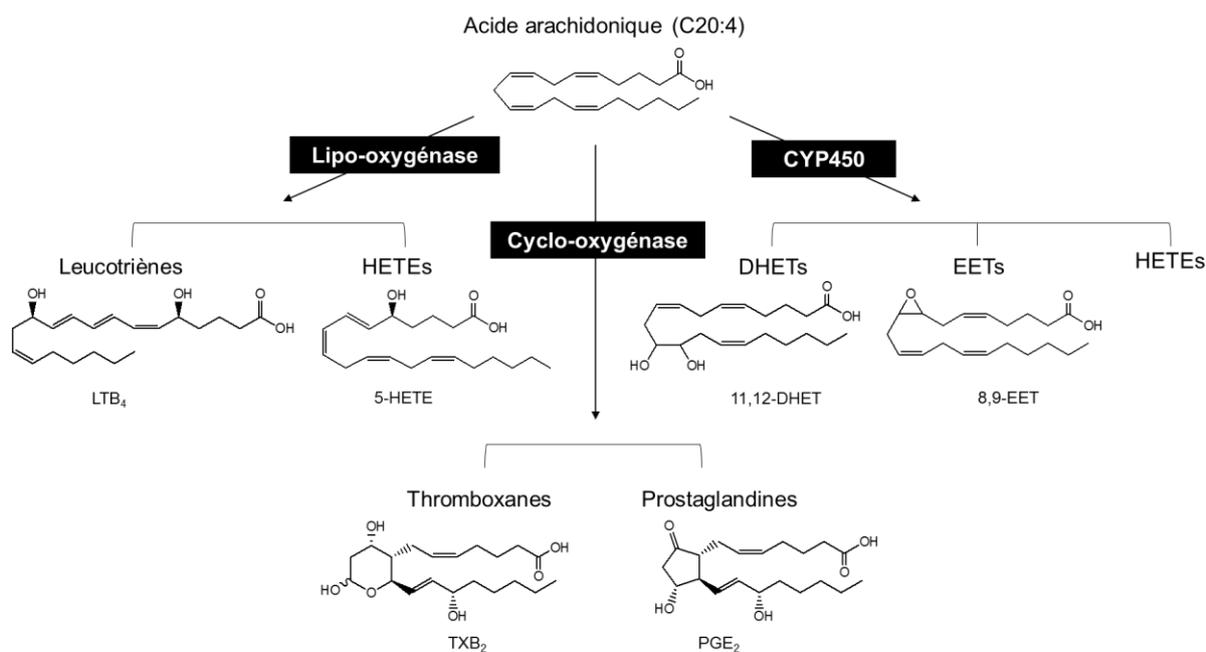


Figure 14 : Différentes voies de synthèse des eicosanoïdes  
 LTB<sub>4</sub> : leucotriène B<sub>4</sub>, TXB<sub>2</sub> : thromboxane B<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>

Les prostaglandines sont caractérisées par un cycle pentyle. Elles sont habituellement désignées par deux lettres, PG, suivie d'une troisième lettre (D, E, F, G ou H) en fonction de la présence ou non de groupements cétones et hydroxyles sur le cycle. Un numéro porté en indice (1, 2, ou 3) indique le nombre d'insaturations sur la chaîne latérale. Les prostaglandines les plus abondantes dans l'organisme sont les  $PGD_2$ ,  $PGE_2$  et  $PGF_{2\alpha}$ , toutes trois formées à partir de la  $PGH_2$ <sup>194</sup>.

Les thromboxanes comportent un cycle pyranique. Tout comme les prostaglandines, elles sont désignées par trois lettres : TX puis A ou B, suivant la nature du substituant porté par le cycle. Le numéro en indice indique le nombre d'insaturations de la chaîne latérale. Les thromboxanes  $TXA_2$  et  $TXB_2$  sont les plus couramment retrouvées chez l'Homme<sup>194</sup>.

Les leucotriènes ne possèdent pas de structure cyclique, mais un groupement triène conjugué. La nature des substituants présents sur la chaîne hydrocarbonée peut être diverse : hydroxyle, époxyde, acide aminé. Selon la structure chimique de ces substituants, une lettre est attribuée (A, B, C, D, E ou F). Le numéro en indice correspond, comme pour les prostaglandines et les thromboxanes, au nombre d'insaturations. Les leucotriènes les plus courantes possèdent quatre doubles liaisons :  $LTA_4$ ,  $LTB_4$ ,  $LTC_4$ , etc.

Les HETEs, les EETs et les DHETs sont caractérisés par la présence d'une fonction hydroxyle, d'un groupement époxyde et de deux hydroxyles, respectivement, sur la chaîne hydrocarbonée. Ainsi, ces molécules présentes de nombreux isomères de position, notamment les HETEs qui possèdent sept isomères.

Tous les eicosanoïdes possèdent en position terminale de la chaîne alkyle un groupement carboxylique, caractéristique des acides gras. Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont des ligands endogènes de  $PPAR\gamma$ , impliqués dans de nombreux processus physiologiques, notamment dans la réponse inflammatoire.

## 2. Les glycérolipides

Les glycérolipides regroupent les trois sous-classes suivantes : les monoacylglycérols, les diacylglycérols et les triacylglycérols. Ces lipides dérivent de l'estérification du glycérol par un, deux ou trois acides gras pour former des mono-, di- et triacylglycérols, respectivement (Tableau 8)<sup>189,195,196</sup>. Les glycérolipides sont hydrophobes, en raison de la présence de chaînes hydrocarbonées.

Tableau 8 : Structure du glycérol et exemple de glycérolipides

Nom	Structure
Glycérol	
Monoacylglycérol (16:0)	
Diacylglycérol (16:0/16:0)	
Triacylglycérol (16:0/16:0/16:0)	

*sn* (*stereospecific numbering*) : numérotation stéréospécifique au niveau du glycérol

### 2.1. Les monoacylglycérols

Les monoacylglycérols (MGs) sont formés par une réaction d'estérification entre le glycérol et un acide gras. Cette réaction est catalysée par une acyltransférase (Figure 15). Les MGs peuvent, également, provenir de l'hydrolyse d'un diacylglycérol, par une lipase<sup>197,198</sup>. Cette hydrolyse libère, alors, un acide gras. Par l'action d'une autre lipase, les MGs peuvent être hydrolysés à leur tour, libérant ainsi une molécule de glycérol et un acide gras<sup>199</sup>. Ces lipides sont donc importants dans le stockage du glycérol.

### 2.2. Les diacylglycérols

Les diacylglycérols (DGs) peuvent être synthétisés par différentes voies. Tout comme les MGs, ils peuvent être produits par l'estérification du glycérol par deux acides gras, et par l'hydrolyse de triacylglycérols<sup>198,200</sup> (Figure 15). Les DGs peuvent aussi provenir de la déphosphorylation d'un acide phosphatidique, catalysée par la phosphatidate phosphatase<sup>197,201</sup>. Les DGs sont les précurseurs de nombreux lipides. Il s'agit d'intermédiaires essentiels dans le métabolisme des glycérolipides, mais également des glycérophospholipides et des acides gras.

### 2.3. Les triacylglycérols

Les triacylglycérols (TGs) désignent les glycérolipides issus de l'estérification successive du glycérol par trois acides gras <sup>201,202</sup>. Par l'action d'une lipase, les TGs peuvent être hydrolysés en DGs, libérant, de ce fait, un acide gras (Figure 15). Les TGs ont un rôle essentiel dans la réserve énergétique. En effet, ils sont stockés dans les lipoprotéines comme source majeure d'énergie, en attendant d'être distribués dans l'organisme. Leur potentiel de stockage énergétique est six fois supérieur à celui du glucose et à plus long terme <sup>201</sup>.

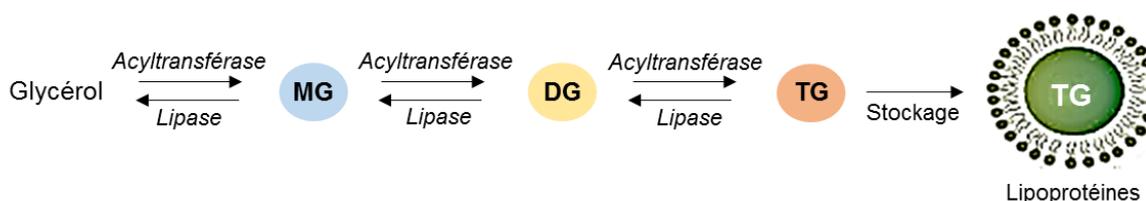


Figure 15 : Schéma simplifié du métabolisme des glycérolipides

### 3. Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides sont formés d'un glycérol estérifié par deux acides gras, saturés ou insaturés, et d'un groupement polaire de nature variable. Ce dernier confère une grande diversité structurale aux glycérophospholipides, puisque six sous-classes sont référencées, selon leur « tête » polaire : les acides phosphatidiques (PAs), les phosphatidylcholines (PCs), les phosphatidyléthanolamines (PEs), les phosphatidylsérines (PSs), les phosphatidylglycérols (PGs), et les phosphatidylinositols (PIs).

Le caractère amphiphile des glycérophospholipides permet leur auto-assemblage en bicouche lipidique, caractéristique des membranes cellulaires. Les groupements polaires sont, alors, dirigés vers l'extérieur de la bicouche, tandis que les chaînes hydrophobes sont orientées vers l'intérieur. Une asymétrie de la bicouche est généralement observée, puisque tous les glycérophospholipides ne sont pas répartis de manière homogène dans les membranes <sup>203</sup>.

#### 3.1. Les acides phosphatidiques

Les acides phosphatidiques, ou glycérophosphates, sont les glycérophospholipides ayant la structure la plus simple. Le substituant du troisième groupement hydroxyle du glycérol est un groupement phosphate, doublement chargé négativement à pH 7 (Figure 16).

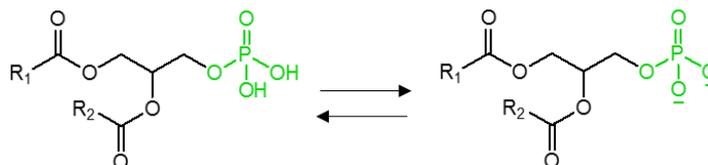


Figure 16 : Structure globale des glycérophosphates

Les PAs ont une place très importante dans la biosynthèse et la dégradation des lipides car ils sont des intermédiaires dans la synthèse des glycérolipides, tels que les DGs, mais aussi de tous les glycérophospholipides <sup>204,205</sup>.

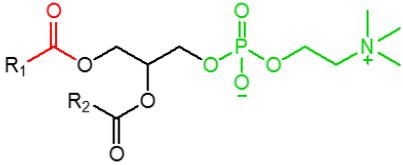
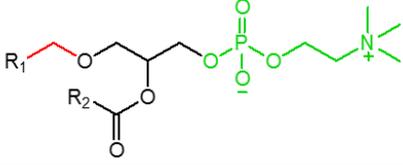
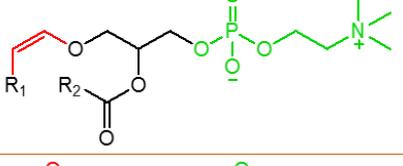
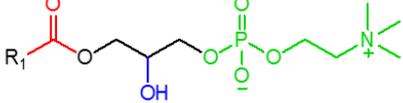
### 3.2. Les phosphatidylcholines

Les phosphatidylcholines sont les glycérophospholipides les plus abondants des cellules eucaryotes. Elles sont caractérisées par un groupement polaire choline liée au glycérol par une liaison phosphodiester. La présence d'un ammonium quaternaire confère aux PCs un caractère zwitterionique à pH 7. Plusieurs sous-classes de PCs sont répertoriées selon la nature de la liaison entre les chaînes d'acides gras et le glycérol (Tableau 9) :

- les diacyl-PCs caractérisées par deux liaisons ester ;
- les alkyl-acyl-PCs, par une liaison éther et une liaison ester ;
- les alkényl-acyl-PCs, également appelées plasmalogènes, par une liaison vinyl éther et une liaison ester.

Chez certaines PCs, l'un des hydroxyles du glycérol est libre, non substitué par une chaîne d'acide gras. Ces lipides, appelés lyso-PCs ou LPCs, sont des intermédiaires dans la biosynthèse des diacyl-PC, ces dernières étant les plus couramment rencontrées dans l'organisme.

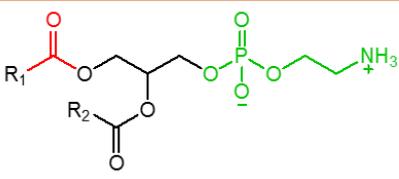
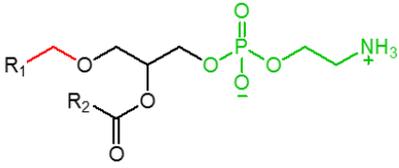
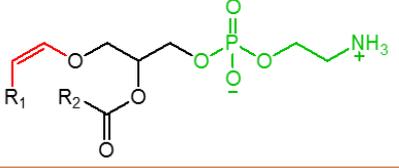
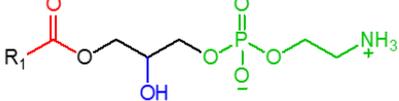
Tableau 9 : Structures des phosphatidylcholines

Nom	Structure
diacyl-PC	
alkyl-acyl-PC	
alkényl-acyl-PC	
lyso-PC	

### 3.3. Les phosphatidyléthanolamines

Les phosphatidyléthanolamines sont caractérisées par leur groupement polaire éthanolamine. Ce sont les deuxièmes glycérophospholipides les plus abondants, après les PCs, dans les cellules eucaryotes. Trois sous-classes de PEs se distinguent par la nature de la liaison entre la chaîne d'acide gras et un des hydroxyles du glycérol. À l'instar des PCs, on retrouve les diacyl-PEs, alkyl-acyl-PEs et alkényl-acyl-PEs. Le groupement hydroxyle en position *sn-2* présent sur le glycérol peut être libre et former, ainsi, les lyso-PEs (Tableau 10). À pH physiologique, les PEs sont sous forme zwitterionique.

Tableau 10 : Structures des phosphatidyléthanolamines

Nom	Structure
diacyl-PE	
alkyl-acyl-PE	
alkényl-acyl-PE	
lyso-PE	

### 3.4. Les phosphatidylsérines

Les phosphatidylsérines, à la différence des autres glycérophospholipides, sont exclusivement présentes dans la couche interne de la membrane plasmique<sup>206</sup>. Les PSs sont chargées négativement à pH 7, en raison de la présence d'une fonction acide carboxylique sur la tête polaire (Figure 17). Contrairement aux PCs et PEs, les PSs existent presque exclusivement sous la forme diacylée.

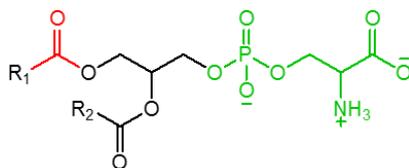


Figure 17 : Structure des phosphatidylsérines

### 3.5. Les phosphatidylglycérols

Les phosphatidylglycérols sont des glycérophospholipides minoritaires, dont le groupement polaire est un glycérol. Ils sont sous forme anionique à pH physiologique (Figure 18). Les PGs sont les précurseurs des cardiolipides. Tout comme les PSs, ils existent majoritairement sous la forme diacylée.

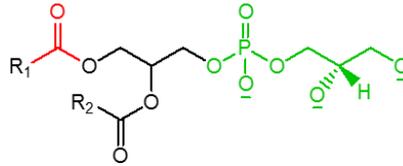


Figure 18 : Structure des phosphatidylglycérols

### 3.6. Les phosphatidylinositols

Les phosphatidylinositols sont minoritaires dans les membranes plasmiques ; ils représentent environ 5 % de la composition en glycérophospholipides <sup>207</sup>. Le groupement inositol présente neuf stéréoisomères, le plus courant étant de loin le L-*myo*-inositol (Figure 19).

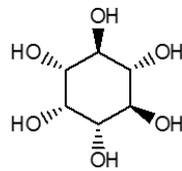


Figure 19 : Structure du L-*myo*-inositol

Les PIs peuvent être phosphorylés jusqu'à trois fois, sur les hydroxyles en position 3, 4 et 5 du cycle, pour former le phosphatidylinositol monophosphate (PIP), bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) et triphosphate (PIP<sub>3</sub>), respectivement (Tableau 11).

Tableau 11 : Structure des phosphatidylinositols et des dérivés mono-, bis- et triphosphates

Nom	Structure
diacyl-PI	
PIP	
PIP2	
PIP3	

PIP : phosphatidylinositol monophosphate, PIP<sub>2</sub> phosphatidylinositol bisphosphate, PIP<sub>3</sub> phosphatidylinositol triphosphate

Les PIs et leurs dérivés phosphatés ont un rôle très important dans la cellule. Ce sont des messagers secondaires impliqués dans le trafic membranaire ainsi que dans le métabolisme, la prolifération et la survie cellulaire<sup>208-210</sup>.

#### 4. Les sphingolipides

Les sphingolipides caractérisent une famille complexe de lipides, comportant une structure commune de type sphingoïde. Chez les mammifères, les bases sphingoïdes les plus communes sont la sphingosine et la sphinganine (Figure 20). Ces structures sont composées d'une chaîne d'acide gras, de deux fonctions hydroxyle et d'un groupement amine.

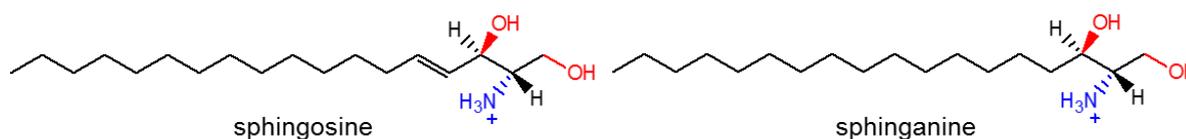


Figure 20 : Structures des bases sphingoïdes majoritaires

Les sphingolipides peuvent être classés en différentes catégories, selon la nature des substituants présents sur les groupements fonctionnels. Parmi ces catégories sont retrouvés les céramides (Cers) et les sphingomyélines (SMs). Les chaînes d'acides gras des sphingolipides comprennent généralement de 18 à 22 carbones, voire davantage.

La présence de sphingolipides dans la bicouche lipidique favorise la rigidité et l'imperméabilité membranaire.

#### 4.1. Les céramides

Les céramides et dihydrocéramides sont biosynthétisés par la formation d'une liaison amide entre un acide gras et une base sphingosine ou sphinganine, respectivement (Figure 21). Cette liaison, difficilement hydrolysable, confère une forte stabilité aux céramides. Les chaînes d'acide gras impliquées comportent généralement de 14 à 26 carbones et sont saturées ou monoinsaturées <sup>195</sup>. Les Cers sont les sphingolipides les plus simples structurellement et sont les précurseurs des sphingomyélines.

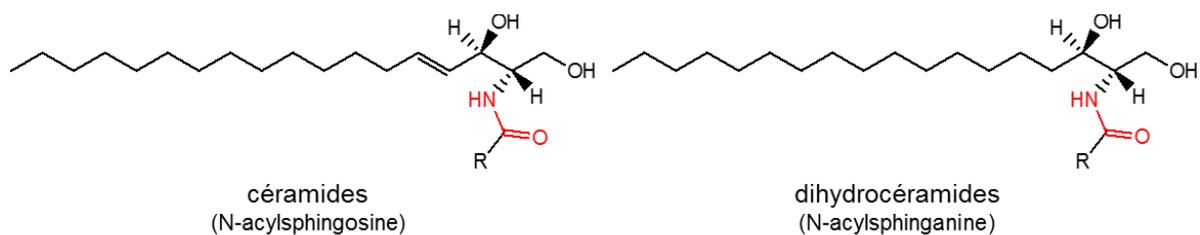


Figure 21 : Structures des céramides et dihydrocéramides

Les Cers jouent un rôle important dans la régulation du stress oxydant et de l'apoptose. Ils sont également impliqués dans la signalisation et la prolifération cellulaire <sup>211-213</sup>.

#### 4.2. Les sphingomyélines

Les sphingomyélines sont formées, à partir d'un céramide, par formation d'une liaison phosphodiester entre le groupement hydroxyle primaire et un radical choline (Figure 22). Les SMs sont les sphingolipides phosphorylés les plus abondants chez les mammifères. Elles sont réparties asymétriquement dans la membrane plasmique puisqu'elles sont uniquement retrouvées dans la couche externe <sup>214</sup>.

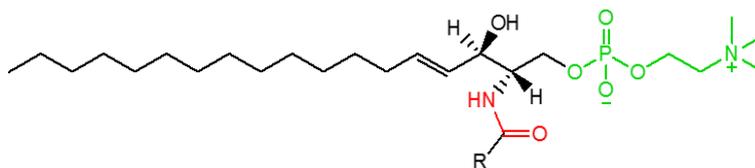


Figure 22 : Structure des sphingomyélines

Tout comme les céramides, les SMs sont impliquées dans la signalisation et la prolifération cellulaire, ainsi que dans le phénomène d'apoptose <sup>214,215</sup>.

## 5. Les stérols

Les stérols constituent une classe de lipides possédant une structure commune de type cyclopentanophénanthrène, *i.e.* un squelette hydrocarboné tétracyclique (Figure 23). La présence des cycles hydrocarbonés confère aux stérols un caractère très hydrophobe. Ce sont des composants majeurs des membranes cellulaires, où ils jouent, notamment, un rôle dans la fluidité membranaire. Les stérols englobent une large gamme de composés, dont le cholestérol et ses métabolites : les oxystérols.

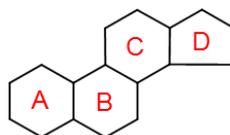


Figure 23 : Structure du squelette commun aux stérols

### 5.1. Le cholestérol

Le cholestérol est le stérol le plus abondant chez les mammifères, majoritairement retrouvé à l'état libre. Il est composé de quatre cycles hydrocarbonés organisés en noyau cyclopentano-perhydro-phénanthrénique substitué par deux groupements méthyle en position 10 et 13, un hydroxyle en position 3 et un groupement 2(R)-6méthylheptan-2-yle en position 17. On note également la présence d'une double liaison sur le cycle B en position 5 et 6 (Figure 24). La molécule possède huit carbones asymétriques, soit 256 stéréoisomères théoriquement possibles, dont un seul est retrouvé dans la nature : le 3 $\beta$ -ol, lévogyre (3(S), 8(S), 9(S), 10(R), 13(R), 14(S), 17(R)) <sup>216</sup>. Le groupement hydroxyle du cycle A constitue la partie polaire du cholestérol. Ce groupement peut, cependant, être estérifié par un acide gras, formant ainsi les esters de cholestéryl, très hydrophobes.

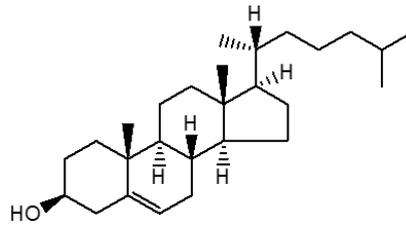


Figure 24 : Structure du cholestérol

Le cholestérol est très présent dans les membranes cellulaires, dans lesquelles il s'intercale entre les chaînes d'acides gras des glycérophospholipides. Sa présence induit une rigidification et une stabilité des membranes. Le cholestérol est également le précurseur de nombreux autres lipides tels que les hormones stéroïdiennes, la vitamine D et les acides et sels biliaires. Un dérèglement du métabolisme du cholestérol peut être à l'origine de pathologies graves, voire mortelles, telles que l'athérosclérose (dépôt de cholestérol sur les parois des artères) à l'origine d'infarctus et d'accidents vasculaires cérébraux<sup>217,218</sup>.

### 5.2. Les oxystérols

Les oxystérols sont les métabolites oxydés du cholestérol, portant généralement des fonctions hydroxyle ou époxyde. L'oxydation se fait préférentiellement sur les cycles A et B, mais également sur la chaîne latérale, conduisant ainsi à une grande diversité des molécules formant la famille des oxystérols. Ces molécules peuvent avoir deux origines : endogène, générées par voie enzymatique et chimique, et exogène par un apport alimentaire<sup>219,220</sup>. Dans les conditions physiologiques, la plupart des oxystérols circulants sont formés à partir du cholestérol, par l'action d'enzymes de type cytochrome P450. Les oxystérols peuvent être séparés en deux catégories : les oxystérols majeurs du plasma, qui regroupent le 27-hydroxycholestérol (27-OH), le 24(S)-hydroxycholestérol (24(S)-OH), le 22(R)-hydroxycholestérol (22(R)-OH), le 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol (7 $\alpha$ -OH) et le 4 $\beta$ -hydroxycholestérol (4 $\beta$ -OH); et les oxystérols mineurs du plasma, englobant le 25-hydroxycholestérol (25-OH), le 7-céto-cholestérol (7-kéto) et le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol (7 $\beta$ -OH). Un schéma montrant le métabolisme du cholestérol est présenté en Figure 25.

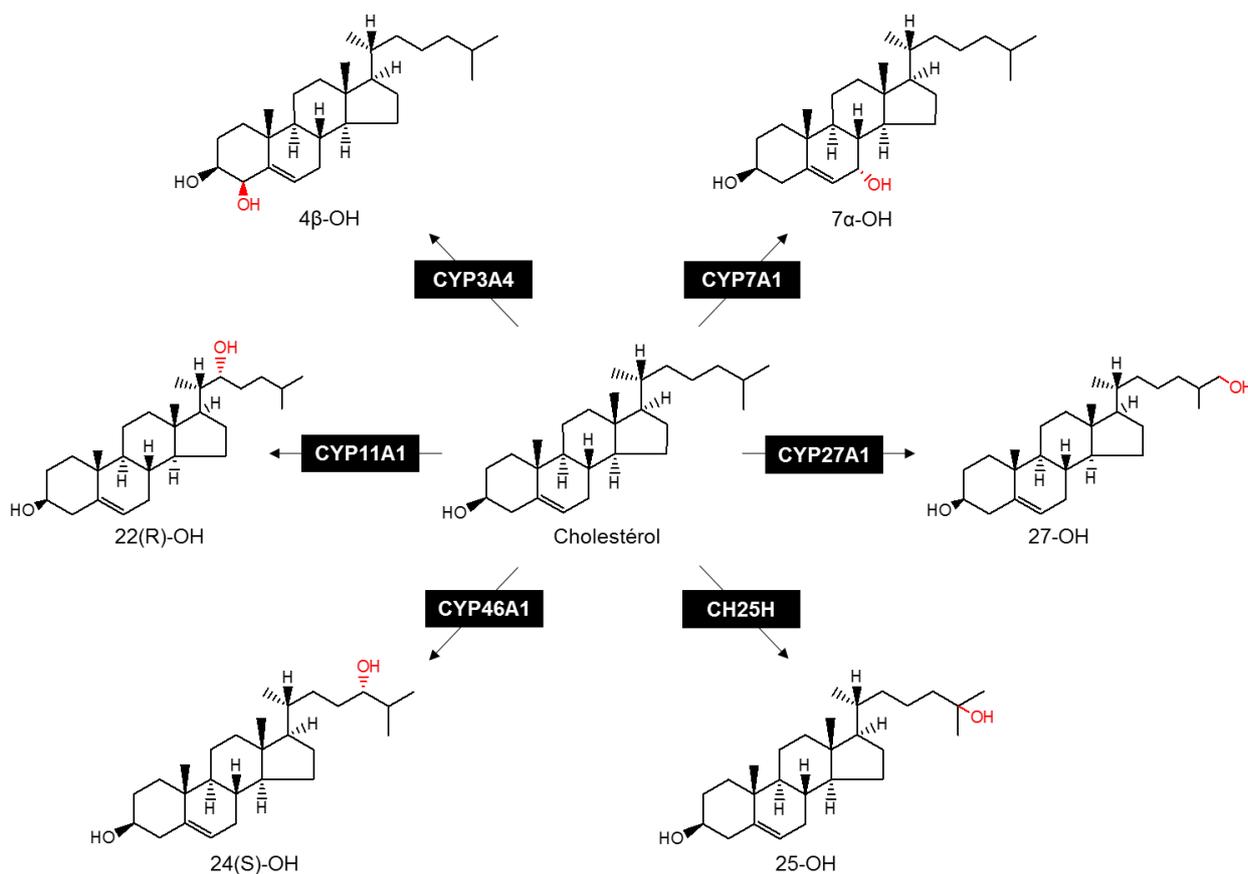


Figure 25 : Métabolisme du cholestérol

CYP3A4 : cholestérol 4β-hydroxylase, CYP7A1 : cholestérol 7α-hydroxylase, CYP27A1 : cholestérol 27-hydroxylase, CH25H : cholestérol 25-hydroxylase, CYP46A1 : cholestérol 24(S)-hydroxylase, CYP11A1 : cholestérol 22(R)-hydroxylase.

Le 7-kéto et le 7β-OH (Figure 26) ne sont pas générés par voie enzymatique mais majoritairement apportés *via* l'alimentation. Ils peuvent également être produits chimiquement à partir du cholestérol, par auto-oxydation <sup>221</sup>.

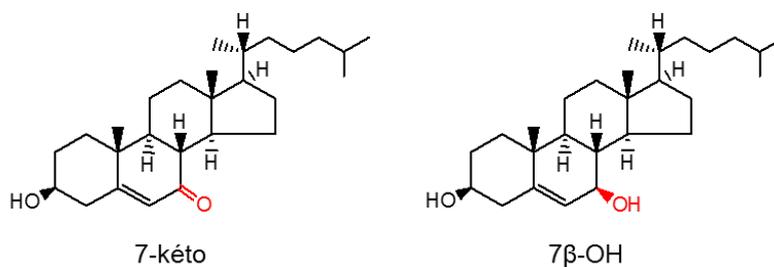


Figure 26 : Structure du 7-céto-cholestérol et du 7β-hydroxycholestérol

Les oxystérols sont des métabolites intermédiaires issus du catabolisme du cholestérol. Ce dernier permet à l'organisme d'éliminer l'excédent de cholestérol en le transformant en oxystérols, plus hydrophiles, donc plus facilement transportés dans le plasma <sup>222</sup>. Les oxystérols sont également des ligands endogènes du récepteur nucléaire LXR et jouent un

rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique, notamment dans l'homéostasie du cholestérol <sup>223,224</sup>.

Les lipides jouent donc un rôle essentiel dans l'organisme. Ils sont impliqués dans un grand nombre de fonctions cellulaires telles que la signalisation et la prolifération. Ils permettent le stockage d'énergie sous forme de triacylglycérols dans les lipoprotéines. Ils peuvent être ligands endogènes de récepteurs nucléaires, c'est notamment le cas des acides gras libres, des eicosanoïdes et des oxystérols. Les glycérophospholipides sont, quant à eux, des constituants majeurs des membranes cellulaires. Toute perturbation dans le métabolisme des lipides pourrait donc avoir de graves répercussions sur les fonctions cellulaires. Dans le cas des cellules trophoblastiques, une perturbation du lipidome pourrait entraîner des effets délétères sur le développement du placenta et ainsi, induire des complications de la grossesse.

Il semble donc essentiel de pouvoir mesurer les perturbations potentielles du lipidome de cellules placentaires dues à la présence du MEHP, contaminant environnemental, ligand exogène de PPAR $\gamma$ . Pour ce faire, l'utilisation d'une méthode « omique », et en particulier de la lipidomique, est nécessaire.

## B. L'analyse lipidomique

Les méthodes dites « omiques » englobent la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique, et permettent l'étude de l'ADN, des ARN messagers, des protéines et des métabolites, respectivement. Ces méthodes sont fondées sur des analyses à haut débit permettant le traitement simultané d'un nombre important de variables.

La métabolomique se définit comme l'analyse de toutes les molécules de petite taille, inférieure à 1 500 Da, présentes dans une cellule, un organe ou un organisme, à un instant donné <sup>225,226</sup>. Le métabolome représente la réponse ultime d'un organisme à une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou à toute cause environnementale <sup>227,228</sup>. Les métabolites étudiés regroupent un grand nombre de composés dont les acides aminés, les vitamines, les sucres, les hormones ou encore les lipides. Dans le but d'étudier plus spécifiquement les altérations de l'ensemble des lipides, ou lipidome, une branche de la métabolomique s'est distinguée : la lipidomique. L'intérêt de la lipidomique repose sur la possibilité d'effectuer des analyses différentielles entre des profils lipidiques issus de diverses expériences, par exemple : patients malades vs sains, exposés à un contaminant vs non exposés, sous traitement médicamenteux vs sans traitement.

L'étude lipidomique se décompose en plusieurs étapes distinctes et primordiales pour l'obtention de résultats interprétables. La première étape consiste en l'extraction sélective des

analytes à partir de la matrice les contenant. Ces derniers sont ensuite analysés, généralement par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse. Enfin, les données obtenues sont retraitées en vue d'effectuer des analyses statistiques adaptées.

## 1. La préparation d'échantillons

La préparation d'échantillon est une étape essentielle car elle conditionne la qualité de l'analyse à suivre. En effet, plus l'échantillon est « propre », meilleure est la sensibilité de l'analyse et, de fait, l'interprétation des résultats en est simplifiée. Face à la diversité des échantillons biologiques étudiés (tissus, organes, cellules, fluides, etc.), les protocoles de préparation d'échantillon doivent être adaptés. Par exemple, pour certaines matrices une étape d'homogénéisation peut être nécessaire. Il s'agit généralement d'un broyage mécanique en présence d'un solvant permettant la libération des analytes de la matrice. À l'issue de l'étape d'homogénéisation, les analytes sont présents dans une phase liquide, et peuvent alors être extraits soit par extraction liquide-liquide, soit par extraction sur phase solide.

### 1.1. L'extraction liquide-liquide

#### 1.1.1. Principe général

L'extraction liquide-liquide (LLE) repose sur la partition d'un composé organique entre une phase aqueuse (échantillon) et un solvant organique non-miscible. Cette partition dépend du coefficient de partage ( $K_p$ ) de l'analyte entre les deux phases (Équation 1).

$$K_p = \frac{[S]_{org}}{[S]_{aq}}$$

Équation 1 : Formule du coefficient de partage d'un analyte entre une phase organique et une phase aqueuse  
[S]<sub>org</sub> : solubilité de l'analyte dans la phase organique, [S]<sub>aq</sub> : solubilité de l'analyte dans la phase aqueuse

Les molécules hydrophobes sont facilement extraites par le solvant organique tandis que les analytes hydrophiles demeurent dans la phase aqueuse.

La LLE est réalisée en plusieurs étapes (Figure 27) :

- l'ajout du solvant organique à la phase aqueuse ;
- une agitation mécanique, afin de mélanger les deux phases et d'extraire au mieux les analytes de la phase aqueuse ;
- une centrifugation permettant la séparation nette des deux phases ;
- la récupération de la phase organique contenant les analytes ;

- l'évaporation du solvant organique pour obtenir des résidus secs ;
- la reprise de ces résidus dans un solvant adapté à l'analyse à suivre.

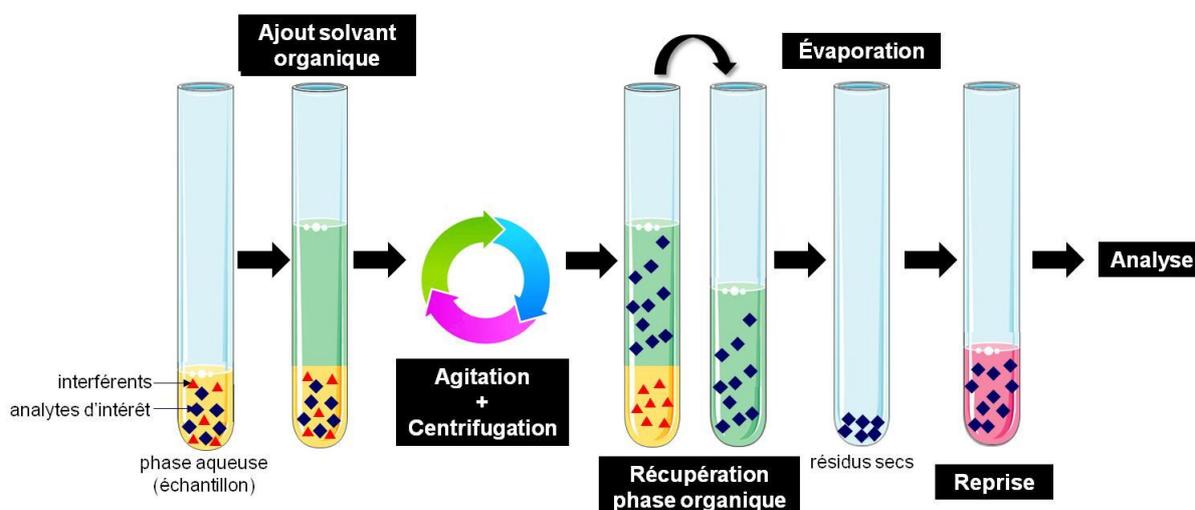


Figure 27 : Étapes de l'extraction liquide-liquide

Un certain nombre de paramètres sont à prendre en compte dans le but d'obtenir un rendement d'extraction maximal des analytes, tels que la nature et le volume de solvant organique utilisé, le nombre d'extractions successives ou encore le pH des phases.

Le solvant organique doit bien solvater les analytes, être non miscible avec la phase aqueuse, être pur, s'évaporer facilement et respecter l'environnement. Un mélange de solvant peut être utilisé afin d'extraire les analytes plus polaires. À volume de solvant constant, il est préférable de fractionner l'extraction car le rendement s'en trouve accru. Dans le cas de molécules présentant des propriétés acido-basiques, un ajustement du pH permet d'augmenter le coefficient de distribution et donc le rendement d'extraction. L'ajout d'un sel, typiquement du chlorure de sodium (NaCl), permet de diminuer la solubilité des analytes dans la phase aqueuse et d'augmenter ainsi le  $K_p$ .

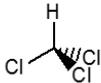
La LLE présente donc un certain nombre d'avantages. Il s'agit d'une méthode simple à mettre en œuvre, nécessitant des équipements basiques de laboratoire. De plus, un large choix de solvants est disponible pour extraire une grande gamme de composés. En revanche, c'est une technique d'extraction relativement longue et difficilement automatisable. Un manque de reproductibilité peut être observé lors de l'étape de récupération de la phase organique, notamment en présence d'une interface émulsionnée suite à l'agitation mécanique. Enfin, la LLE utilise une quantité non négligeable de solvants toxiques tels que le chloroforme ou le cyclohexane. La LLE reste, tout de même, la méthode d'extraction la plus couramment utilisée pour les lipides <sup>229,230</sup>.

### 1.1.2. Application aux lipides

Lors d'une étude lipidomique, il est primordial de pouvoir extraire l'ensemble des lipides présents dans l'échantillon biologique. La gamme de polarité des lipides étant très étendue un mélange de solvants organiques est nécessaire. Le caractère hydrophobe et hydrophile des molécules est défini par le logP, correspondant au logarithme du coefficient de partage pour le système octanol/eau. Ainsi, un logP positif et élevé est caractéristique d'un composé hydrophobe tandis qu'un logP négatif caractérise une molécule hydrophile. Un logP nul, indique que le composé est soluble à part égale dans l'eau et l'octanol. Le logP des lipides est compris entre 5 pour les phosphatidylcholines, et 22 pour les triacylglycérols ; ils s'agit donc de composés moyennement à très hydrophobes <sup>231</sup>.

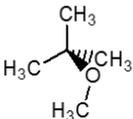
En 1957, l'une des premières méthodes d'extraction de lipides a été proposée par Folch. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un mélange chloroforme/méthanol, en proportion 2/1 v/v, représentant 20 fois le volume d'échantillon <sup>232</sup>. L'utilisation d'un mélange de solvants de polarité différente permet l'extraction de différentes classes de lipides à partir de la phase aqueuse. La méthode de Folch est une référence pour l'extraction des lipides. Cependant, d'autres méthodes ont été développées afin, notamment, de diminuer la quantité de solvants nécessaire à l'extraction. En 1959, la méthode de Bligh et Dyer, dérivée de Folch, a permis de réduire considérablement la quantité de solvant employés. En effet, cette technique utilise un mélange chloroforme/méthanol, en proportion 1/1 v/v, représentant cette fois cinq fois le volume d'échantillon <sup>233</sup>. De plus, une meilleure séparation de phase est obtenue, en un temps plus court que par la méthode de Folch. La majorité des études lipidomiques sont fondées sur l'utilisation d'un mélange binaire chloroforme/méthanol pour l'extraction des lipides. Cependant, face à la toxicité du chloroforme (Tableau 12), des solvants alternatifs ont été testés, tels que le dichlorométhane <sup>234</sup> et le *tert*-butyl méthyl éther (MTBE) <sup>235</sup>.

Tableau 12 : Classification réglementaire du chloroforme

<b>Chloroforme</b>	
CAS	67-66-3
Structure chimique	
Phrases-H	H302: nocif en cas d'ingestion H315: provoque une irritation cutanée H319: provoque une sévère irritation des yeux H331: toxique par inhalation H336: peut provoquer somnolence ou vertiges H351: susceptible de provoquer le cancer H361d: susceptible de nuire au fœtus H372: risque avéré d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
Pictogrammes	

En 2008, Matyash *et al.* ont proposé une nouvelle méthode d'extraction à l'aide d'un mélange MTBE/méthanol, en proportion 10/3 v/v, représentant environ 50 fois le volume d'échantillon. Bien qu'elle nécessite un grand volume de solvant, cette méthode est aujourd'hui de plus en plus utilisée car elle permet d'obtenir des rendements comparables, voire supérieurs, à ceux obtenus avec la méthode de Folch et celle de Bligh et Dyer. De plus, le MTBE, utilisé pour le remplacer est beaucoup moins toxique que le chloroforme (Tableau 13). Il est aussi moins dense que l'eau, ce qui facilite le prélèvement de la phase organique.

Tableau 13 : Classification réglementaire du MTBE

<b>MTBE</b>	
CAS	1634-04-4
Structure chimique	
Phrases-H	H225: liquide et vapeurs très inflammables H315: provoque une irritation cutanée
Pictogrammes	

La LLE est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des lipides. Selon le type de matrices ou le type de lipides recherchés, chacune des méthodes précédemment citées peut être adaptée en termes de proportions et de volumes de solvant.

Une autre technique est, également, régulièrement employée pour l'extraction des lipides : l'extraction sur phase solide.

## 1.2. L'extraction sur phase solide

### 1.2.1. Principe général

L'extraction sur phase solide (SPE) est fondée sur la rétention de molécules sur une phase stationnaire solide. La rétention du composé dépend alors de son affinité relative pour la phase stationnaire et la phase mobile liquide dans laquelle il se trouve en solution. La SPE comporte les étapes suivantes (Figure 28) :

- conditionnement,
- percolation,
- lavage(s),
- élution.

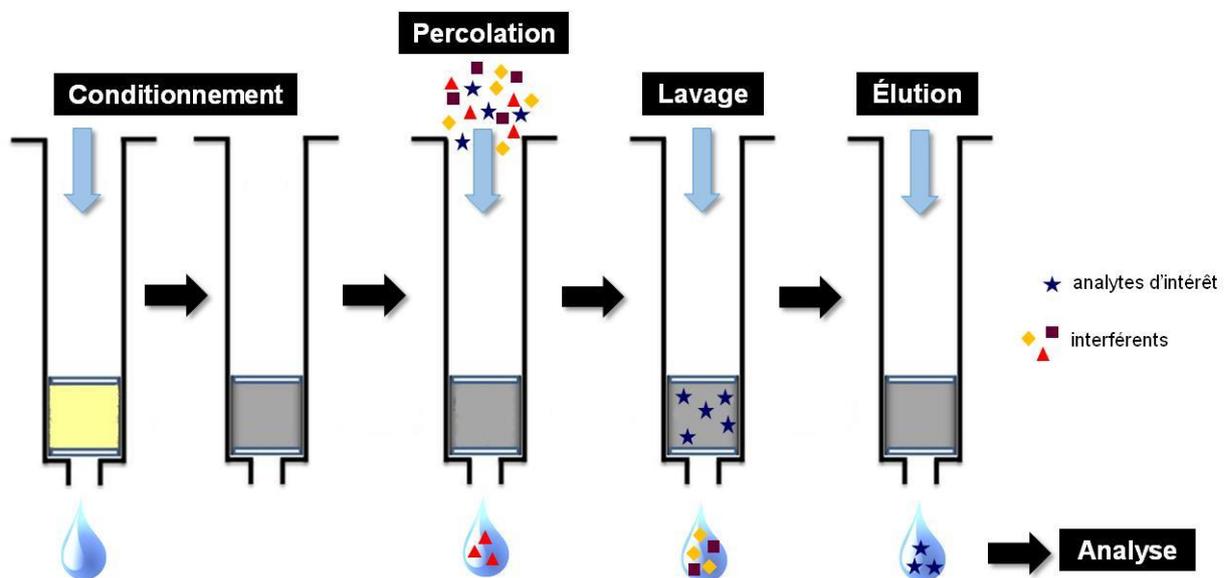


Figure 28 : Étapes de l'extraction sur phase solide

L'étape de conditionnement consiste à imprégner la phase stationnaire par un solvant adéquat, généralement du méthanol, puis de l'eau et à le mettre en équilibre. Cette étape est très importante car elle prépare la phase stationnaire au dépôt de l'échantillon. Une étape de conditionnement insuffisante ou mal conduite peut fausser la rétention des analytes.

Lors de la percolation (dépôt de l'échantillon liquide), l'analyte cible échange des interactions avec la phase stationnaire sur laquelle il est retenu, tandis que les molécules ayant plus d'affinité pour la phase mobile aqueuse ne sont pas retenues.

À la suite du dépôt ayant conduit à la rétention des analytes cibles, un ou plusieurs lavages sont effectués afin d'éliminer les molécules interférentes retenues sur la phase stationnaire alors qu'elles ne font pas partie des analytes d'intérêt. Il s'agit donc en quelque sorte d'une étape de purification de l'échantillon. Les lavages doivent être accomplis par des solvants organiques permettant d'éliminer les interférents, sans éluer l'analyte d'intérêt. L'utilisation de solvants à faible pouvoir éluant vis-à-vis des analytes d'intérêt est donc nécessaire.

Enfin, l'élution est obtenue à l'aide d'un solvant ou d'un mélange de solvants permettant de rompre les interactions entre l'analyte d'intérêt et la phase stationnaire. Un solvant à fort pouvoir éluant vis-à-vis des molécules cibles, est alors nécessaire.

L'extraction par SPE est, généralement, réalisée à l'aide de cartouches commerciales. Ces dernières contiennent la phase stationnaire comprimée entre deux frittés. Le rendement d'extraction dépend de plusieurs paramètres dont le type de phase stationnaire, la capacité des cartouches, la nature, le pH et le volume de solvants utilisés lors des étapes de lavage et d'élution.

Différentes phases stationnaires sont commercialisées, selon le type de rétention désiré. Pour des échantillons aqueux, des phases hydrophobes constituées de silice greffée  $C_8$  et  $C_{18}$  sont le plus souvent utilisées. Des phases stationnaires encore plus hydrophobes de type copolymère polystyrène-divinylbenzène et support carboné sont également disponibles mais leur utilisation peut entraîner une rétention très forte rendant l'élution difficile. Pour des échantillons organiques de type pétrole, huiles, cosmétiques, des phases polaires sont disponibles. Elles sont principalement constituées de silice vierge ou greffée par des groupements polaires tels que les fonctions amines, diols ou nitriles <sup>236</sup>. Enfin, des phases stationnaires, plus sélectives, utilisant un mode de rétention mixte existent. Il s'agit de supports de silice greffée par des chaînes alkyles auxquelles sont ajoutés des groupements ionisés acides ( $COO^-$ ,  $SO_3^-$ ) ou basiques ( $NRH^+$ ,  $NR_3^+$ ). L'analyte d'intérêt est alors retenu à la fois par des interactions électrostatiques et hydrophobes. Le pH des solutions est un paramètre très important pour garantir la sélectivité de ce type d'extraction.

Les propriétés physico-chimiques des analytes d'intérêt contenus dans l'échantillon conditionnent le choix de la phase stationnaire et donc, celui des différents solvants utilisés pour constituer la phase mobile. Pour un échantillon aqueux, l'élution est obtenue à l'aide d'un solvant hydrophobe tandis que celle d'un échantillon organique nécessite un solvant plus

polaire. La force éluante des solvants (Figure 29) est donc un paramètre essentiel à prendre en compte afin d'obtenir un rendement d'extraction maximal.

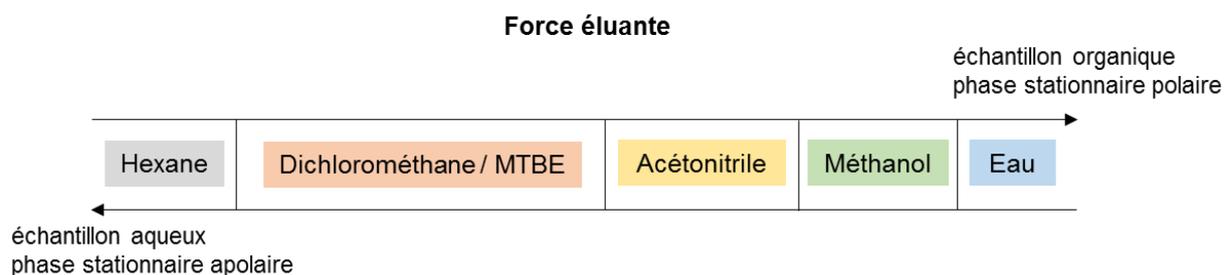


Figure 29 : Force éluante des principaux solvants de SPE

La SPE offre de nombreux avantages. C'est une méthode de choix pour l'extraction de molécules hydrophobes à partir de matrices aqueuses. Elle permet de purifier l'échantillon et de préconcentrer les analytes qu'il contient. La SPE, plus facilement que la LLE, peut être automatisée et couplée en ligne avec les techniques d'analyses. Face à l'utilisation grandissante de la SPE, de nombreux supports sont aujourd'hui disponibles afin d'extraire une large gamme de composés. Cependant, malgré l'utilisation de support de rétentions mixtes, un manque de sélectivité est tout de même observé en SPE. De plus, cette technique n'est pas adaptée à l'extraction de molécules très polaires à partir de matrices aqueuses. En revanche, les composés hydrophobes tels que les lipides peuvent tout à fait être extraits par SPE.

### 1.2.2. Application aux lipides

En lipidomique, la SPE est utilisée, en particulier, pour séparer les différentes classes de lipides. En 1985, Juaneda *et al.* ont utilisé la SPE afin de séparer les lipides polaires et hydrophobes, après une extraction des lipides totaux par la méthode de Folch<sup>237</sup>. La phase stationnaire utilisée est alors polaire, constituée de silice vierge ; les lipides hydrophobes sont élués en premier par du chloroforme, puis les lipides polaires sont élués par du méthanol. La SPE est généralement couplée à une première extraction par LLE afin de purifier l'échantillon et de l'enrichir spécifiquement en certaines classes de lipides. Suivant l'étude, différentes extractions peuvent être employées. Dans le cas d'analyses ciblant une classe de lipides, la SPE offre une meilleure sélectivité que la LLE<sup>238,239</sup>. C'est le cas notamment pour l'analyse des acides gras libres et des eicosanoïdes<sup>240-242</sup>. Des phases stationnaires constituées de polymères fonctionnalisés, de type « hydrophiles-lipophiles », sont le plus couramment utilisées. Il s'agit généralement de supports de polystyrène-divinylbenzène fonctionnalisés avec des groupements plus polaires de type acétyle, sulfonate ou pyrrolidone<sup>243-245</sup>. Ces

phases offrent l'avantage d'être stables sur une large gamme de pH, contrairement à la silice qui n'est stable qu'entre pH 2 et 8, et permettent la rétention de composés de polarités très variable.

L'extraction des lipides constitue la première étape d'une analyse lipidomique et est primordiale pour cette dernière. Dans le contexte d'une analyse lipidomique globale, l'utilisation de la LLE offre l'avantage de permettre l'extraction d'un grand nombre de classes lipidiques. Elle est également facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. En revanche, pour une étude ciblée, la SPE est préférable car plus sélective <sup>246</sup>. Cette technique est automatisable, limitant ainsi le risque de contamination, et utilise de faibles volumes de solvants en comparaison de la LLE. Dans le cadre de mes travaux de thèse, les deux méthodes d'extraction ont été employées : la LLE dérivée de la méthode de Matyash *et al.* et la SPE avec différents types de supports.

## 2. La séparation chromatographique

L'utilisation d'une méthode chromatographique permet de séparer les molécules d'un mélange complexe. Différentes techniques chromatographiques existent et toutes sont fondées sur la distribution des espèces entre deux phases non miscibles : une phase solide dite stationnaire et une phase dite mobile, en mouvement dans le dispositif. La phase mobile a pour rôle d'entraîner les molécules tandis que la phase stationnaire les retient. Si la vitesse de déplacement des molécules diffère, elles peuvent alors être séparées. En fonction de l'affinité relative d'un analyte pour la phase stationnaire et la phase mobile, celui-ci est plus ou moins retenu sur le support (Figure 30).

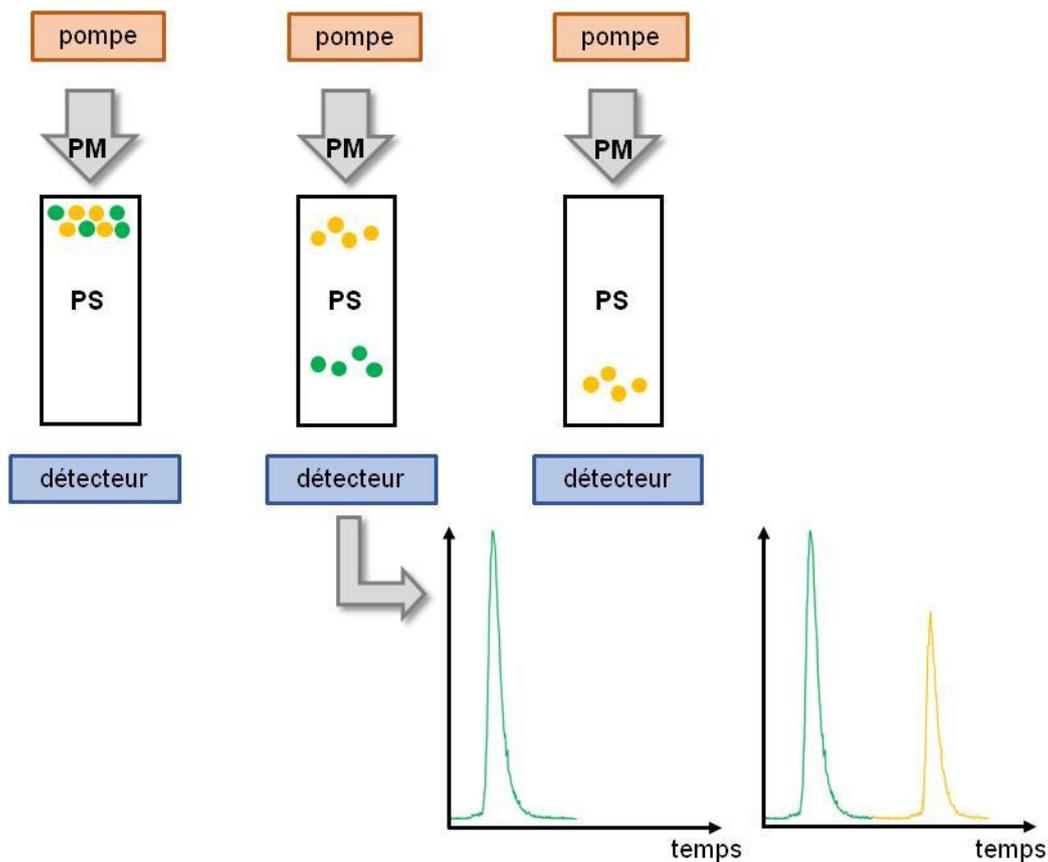


Figure 30 : Schéma d'une séparation chromatographique  
 PM : phase mobile, PS : phase stationnaire

Les premières expériences de chromatographie ont été réalisées sur papier, la phase stationnaire étant alors un morceau de papier en cellulose et la phase mobile un mélange eau/solvant organique dont la migration se fait par capillarité. Par la suite, la chromatographie sur couche mince a été développée. Dans ce cas, la phase stationnaire est un gel de silice immobilisé sur une plaque de verre, un film d'aluminium ou de matière plastique. Enfin, les méthodes chromatographiques ont été adaptées sur colonne. La phase stationnaire est alors conditionnée dans un cylindre métallique appelé colonne et la phase mobile est un fluide qui migre sous l'effet d'une pression. Parmi les techniques chromatographiques sur colonne, on distingue principalement la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC). La GC permet la séparation de composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans se décomposer par chauffage. Cette technique est donc limitée à l'étude de molécules volatiles et stables thermiquement. La GC n'est donc pas adaptée à la séparation de lipides, à moins de faire précéder l'analyse chromatographique d'une étape de dérivation afin de les rendre volatils. Dans le contexte d'une analyse lipidomique, la LC présente un certain nombre d'avantages : elle permet la séparation de composés de polarité très variable et thermolabiles et autorise un large choix de phases stationnaires ainsi que le couplage à un

grand nombre de méthodes de détection souvent très sensibles. En LC, la séparation est fondée sur la distribution des analytes entre la phase stationnaire solide et la phase mobile liquide. Cette distribution peut être contrôlée notamment par l'adsorption, le partage, l'échange d'ion, l'exclusion stérique et l'appariement d'ions. Dans le cadre d'une analyse lipidomique, la séparation des lipides est généralement fondée sur la chromatographie de partage, et plus particulièrement à polarité de phase normale ou inversée.

## 2.1. *La chromatographie liquide à polarité de phase normale*

### 2.1.1. Principe général

La chromatographie liquide à polarité de phase normale (NPLC), ou chromatographie de partage normal, est fondée sur l'utilisation d'une phase stationnaire polaire et d'une phase mobile hydrophobe. La phase stationnaire est constituée de silice greffée par des groupements polaires de type hydroxyle, aminopropyle ou cyanopropyle. Des interactions spécifiques peuvent intervenir entre les groupements polaires des analytes et ceux de la phase stationnaire. Le solvant de base en NPLC est un alcane, favorisant la rétention puisque sans affinité pour la phase stationnaire. Le solvant éluant est plus polaire : acétate d'éthyle, dichlorométhane ou MTBE. Il limite la rétention par sa forte affinité pour la phase stationnaire. Effectivement, en NPLC le mécanisme de rétention repose sur la compétition entre l'analyte et le solvant éluant, appelé modificateur polaire, pour occuper les sites d'interaction sur la phase stationnaire. Ainsi, plus la teneur en solvant polaire augmente, plus la rétention des analytes diminue. L'ordre d'élution des molécules se fait par polarité croissante.

### 2.1.2. Application à la lipidomique

En NPLC, les lipides sont majoritairement retenus sur la phase stationnaire selon la nature de leur tête polaire, et dans une moindre mesure selon la chaîne d'acide gras <sup>247</sup>. Ainsi, les glycérolipides, très peu polaires, sont élués rapidement, tandis que les glycérophospholipides sont d'avantage retenus sur la phase stationnaire. Une séparation nette est observée entre les sous-classes de glycérophospholipides, les plus hydrophobes étant élués en premier (Figure 31).

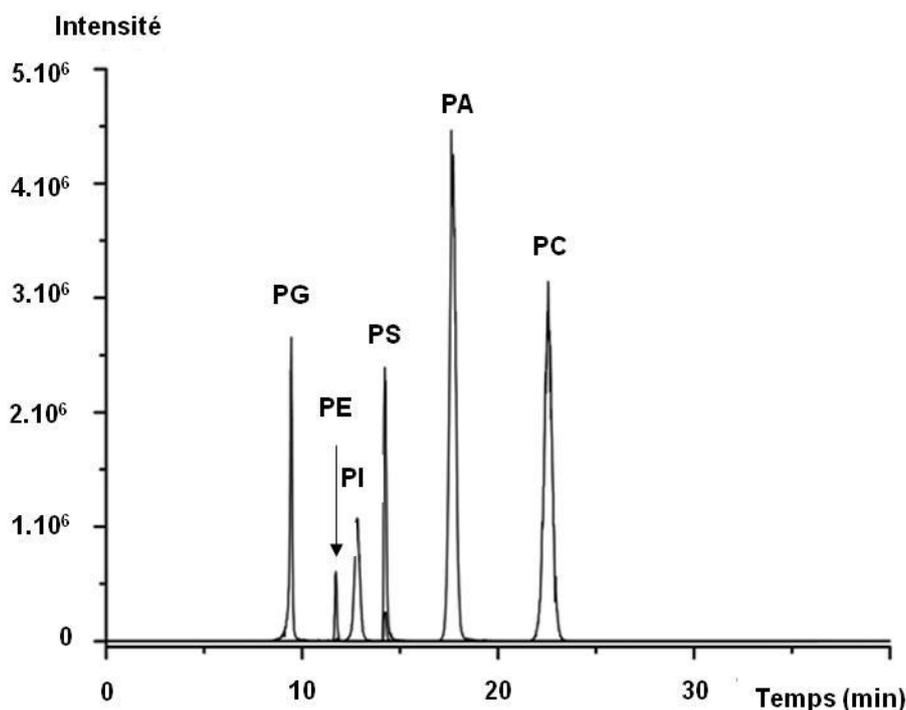


Figure 31 : Séparation de glycérophospholipides standards en chromatographie de partage normal, sur phase stationnaire de silice vierge (d'après <sup>247</sup>)

La séparation des lipides en NPLC se fait généralement sur des phases polaires de silice vierge. Le solvant de base est constitué d'heptane, de chloroforme ou d'un mélange hexane/isopropanol, tandis que le solvant éluant est de type méthanol ou acétonitrile <sup>231</sup>. Des additifs, tels que l'hydroxyde et l'acétate d'ammonium, sont souvent employés afin d'augmenter la résolution chromatographique et la détection, par spectrométrie de masse, à suivre <sup>230</sup>.

## 2.2. La chromatographie liquide à polarité de phase inversée

### 2.2.1. Principe général

La chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC), ou chromatographie de partage inverse, repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire hydrophobe et d'une phase mobile hydrophile. À l'instar de la SPE, différentes phases stationnaires existent : les silices greffées alkyle (octyle, octadécyle), les copolymères organiques macroporeux (polystyrène-divinylbenzène) et les carbones graphites poreux. La rétention est alors fondée sur des interactions hydrophobes entre les analytes et les chaînes hydrocarbonées de la phase stationnaire. L'eau est le solvant de base en RPLC et le solvant éluant est un solvant organique de type méthanol, éthanol, acétonitrile ou isopropanol. L'éluion a lieu par rupture des interactions hydrophobes par le solvant éluant. Ainsi, plus la teneur en solvant hydrophobe

augmente, plus la rétention des composés diminue. L'ordre d'éluion des molécules se fait par polarité décroissante.

### 2.2.2. Application à la lipidomique

En RPLC, les lipides sont plus ou moins retenus selon la nature de la chaîne hydrocarbonée. Plus la chaîne d'acide gras est longue, plus la rétention du lipide est forte. À l'inverse, plus le nombre d'insaturations de la chaîne augmente, moins le lipide est retenu. Un paramètre combinant la longueur des chaînes et le nombre d'insaturations a été défini. Il s'agit du nombre de carbones équivalent ECN, tel que  $ECN = CN - 2n$ , avec CN le nombre de carbones des chaînes et n le nombre d'insaturations. En RPLC, les lipides d'une même classe ne sont donc pas séparés selon leur motif polaire mais par leurs chaînes d'acides gras (Figure 32).

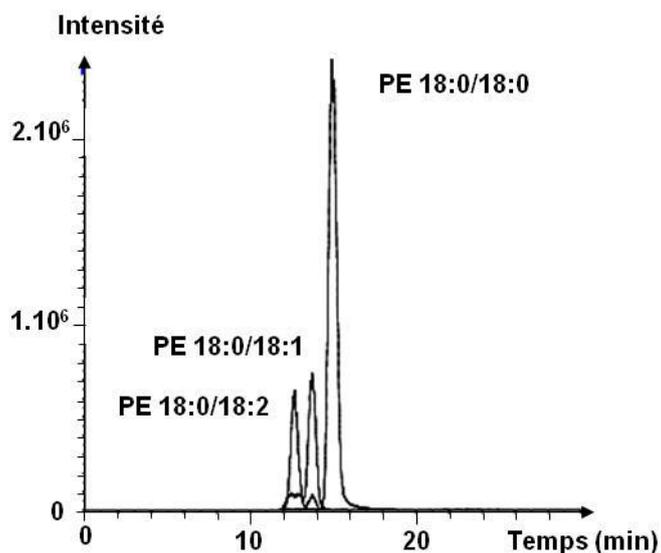


Figure 32 : Séparation de phosphatidyléthanolamines avec un nombre d'insaturations différent en chromatographie de partage inverse, sur une phase stationnaire de silice greffée C<sub>18</sub> (d'après <sup>247</sup>)

Les phases stationnaires les plus utilisées en lipidomique sont des supports de silice greffée C<sub>18</sub>, stable sur une gamme de pH allant de 1 à 12. Le solvant de base est généralement un mélange méthanol/eau ou acétonitrile/eau, tandis que le solvant éluant, plus hydrophobe, est un mélange méthanol/isopropanol ou acétonitrile/isopropanol <sup>230,231</sup>. Les phases mobiles contiennent souvent des additifs tels que l'acétate ou le formate d'ammonium, l'acide acétique ou l'acide formique.

Les lipides étant des molécules de taille intermédiaire plutôt hydrophobes, la RPLC semble être la méthode de choix pour mener à bien une analyse lipidomique globale. Cette

technique permet de séparer les lipides selon leur caractère hydrophobe, généralement estimé par le logP. La RPLC est également appropriée pour des analyses plus ciblées sur certaines classes de lipides. L'étude des stéroïdes et oxystéroïdes, ainsi que des eicosanoïdes, se fait majoritairement en RPLC et permet de séparer les différentes espèces lipidiques de ces classes <sup>240,242,248,249</sup>.

### 2.3. Paramètres importants en chromatographie et avancées technologiques

Plusieurs paramètres doivent être pris en compte en vue d'obtenir la meilleure séparation possible des composés. Le choix de la colonne, *i.e.* la nature de la phase stationnaire, la taille des particules, la longueur et la porosité de la colonne, est à définir en fonctions des molécules à séparer (polarité, taille, quantité etc). La température de la colonne, la nature des solvants et le débit de phase mobile sont également des paramètres influençant la rétention.

La séparation peut être décrite par différents paramètres thermodynamiques et cinétiques. Le facteur de sélectivité  $\alpha$  caractérise la distance entre les sommets de deux pics consécutifs. Plus la sélectivité est grande et meilleure est la séparation. C'est une grandeur thermodynamique fonction de la température et de la nature des phases. Cependant, ce paramètre n'est pas suffisant pour décrire la séparation puisqu'il ne donne pas d'information sur la forme des pics à la base. L'efficacité  $N$ , ou nombre de plateaux théoriques, est un paramètre cinétique qui exprime la relation entre le temps de rétention et la largeur du pic déterminée à la base ou à mi-hauteur. Il correspond au nombre de zones où se produit un équilibre de partage de l'analyte entre la phase mobile et la phase stationnaire. Plus  $N$  est grand, plus la cinétique d'échanges est favorable et plus les pics sont fins. Ce paramètre décrit la qualité de la colonne et son potentiel séparatif. Une séparation chromatographique doit être décrite par la combinaison des paramètres de sélectivité et d'efficacité. Un autre facteur est alors employé : la résolution  $R$ . Cette grandeur compare l'écart au sommet à la largeur à la base, elle est donc fonction de la distance séparant deux pics et de la largeur à la base. Ce paramètre traduit la qualité de la séparation. La résolution est bonne pour une valeur supérieure ou égale à 1,25.

Des avancées technologiques dans le domaine de la chromatographie, et notamment, dans la synthèse de phases stationnaires, ont permis d'améliorer considérablement les performances de cette technique. Des technologies telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC) permettent d'effectuer la séparation d'un grand nombre de composés, sur un temps relativement court, tout en diminuant la quantité de solvants employés. L'UPLC, en particulier, utilise des particules de très faible granulométrie (< 2  $\mu\text{m}$ ) permettant d'accroître la résolution

chromatographique, obligeant toutefois de travailler à des pressions élevées (jusqu'à 1000 bars). Une résolution accrue permet d'affiner les pics chromatographiques, d'augmenter le rapport signal/bruit et d'améliorer la sensibilité, permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre de composés présents en faible quantité dans le même échantillon biologique<sup>246,250,251</sup>. L'UPLC semble donc la technique de choix pour les analyses lipidomiques. De plus, la possibilité de couplage avec des systèmes de détection performants, tels que la spectrométrie de masse offre un avantage considérable.

### 3. Le système de détection par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/nombre de charge ( $m/z$ ). Bien que la spectrométrie de masse soit apparue au début du XX<sup>ème</sup> siècle, suite aux travaux de Thomson<sup>252</sup>, cette technique connaît un véritable essor depuis les années 1960. Il s'agit aujourd'hui de la technique de détection la plus utilisée dans le cadre d'analyses « omiques », du fait de sa grande sensibilité et de la possibilité de couplage avec les différentes techniques chromatographiques. Différents spectromètres de masse sont commercialisés, tous composés d'une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur relié à un système de traitement informatique (Figure 33).

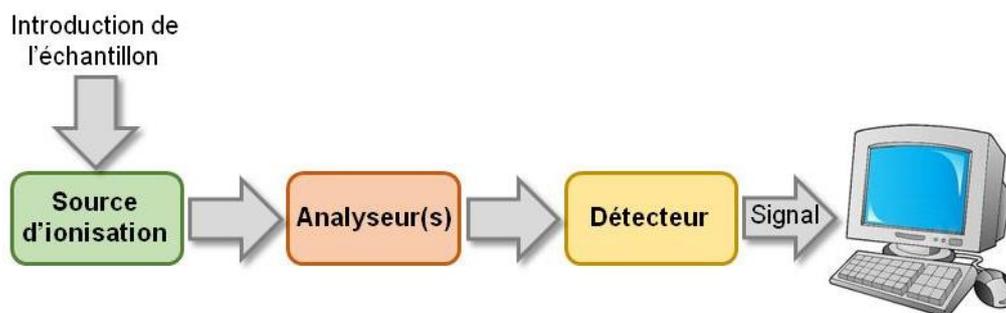


Figure 33 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse

#### 3.1. Les sources d'ionisation

En sortie de colonne chromatographique, les molécules sont présentes en phase liquide et ne sont généralement pas chargées. Une étape d'ionisation et un passage à l'état gazeux sont donc nécessaires. Par la suite, l'application de champs électriques ou magnétiques permet la séparation des ions formés en fonction de leur rapport  $m/z$ . Lors du couplage de la spectrométrie de masse à la LC, différentes méthodes d'ionisation peuvent être utilisées, telles que l'électronébulisation (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ou la

photoionisation à pression atmosphérique (APPI). Dans le cadre de ma thèse je me suis intéressée plus particulièrement à l'ESI et à l'APPI.

### 3.1.1. L'électronébulisation

L'électronébulisation, inventée par Dole *et al.* en 1968<sup>253</sup>, est la première méthode d'ionisation dite « douce », c'est-à-dire générant des ions relativement stables. L'ESI repose sur l'introduction de l'échantillon à l'état liquide dans la source d'ionisation maintenue à pression atmosphérique par l'intermédiaire d'un capillaire très fin. Le capillaire est porté à un haut potentiel électrique (plusieurs kV) ce qui induit, à l'extrémité de celui-ci, l'accumulation de charges formant un cône dit « cône de Taylor »<sup>254</sup> (Figure 34). Par répulsion coulombienne, de fines gouttelettes chargées, constituées de molécules de solvant et d'analytes, se détachent du cône de Taylor pour former un nébulisat. Les molécules de solvant sont évaporées progressivement par passage d'un flux d'azote chauffé. Par conséquent, la taille des gouttelettes diminue, augmentant ainsi la densité de charge qu'elles portent. Une explosion coulombienne se produit lorsque la répulsion entre les charges des analytes devient supérieure à la tension de surface des gouttelettes. Celles-ci explosent alors en gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'à conduire à des ions en phase gazeuse<sup>253,255</sup>.

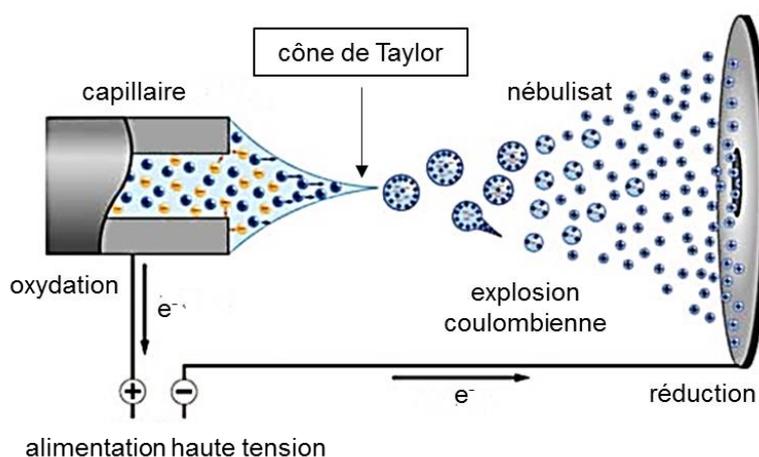


Figure 34 : Principe de l'électronébulisation en mode positif (d'après<sup>256</sup>)

La charge des ions dépend de leur affinité pour les protons, les métaux alcalins et les halogènes. Le plus souvent, les ions chargés positivement sont formés par addition d'un proton  $[M+H]^+$ , d'un ion sodium  $[M+Na]^+$ , d'un ion ammonium  $[M+NH_4]^+$  ou d'un ion potassium  $[M+K]^+$ , tandis que les ions chargés négativement sont formés par perte d'un proton  $[M-H]^-$  ou par addition d'un ion chlorure  $[M+Cl]^-$ . Des ions multichargés  $[M+nH]^{n+}$  et  $[M-nH]^{n-}$ , peuvent également être formés en ESI.

L'ESI est la méthode d'ionisation la plus utilisée en analyse par spectrométrie de masse, notamment lors du couplage avec la chromatographie liquide (LC/MS). Les lipides sont des molécules susceptibles de capter ou perdre facilement un proton ou un métal alcalin. L'ESI semble donc être la méthode d'ionisation la plus adaptée à l'analyse lipidomique. De fait, les glycérolipides et les stéroïdes sont très bien détectés en mode d'ionisation positif (ESI+), tandis que les acides gras libres et les eicosanoïdes sont observés en mode d'ionisation négatif (ESI-). Les glycérophospholipides et les sphingolipides sont, quant à eux, généralement ionisables dans les deux modes. En revanche, certains lipides tels que les oxystéroïdes ne sont pas facilement ionisables en ESI ; l'utilisation d'une autre source d'ionisation est donc nécessaire.

### 3.1.2. La photoionisation à pression atmosphérique

La photoionisation à pression atmosphérique est une méthode plus récente que l'ESI puisqu'elle a été introduite en 1983, suite aux travaux de Baim *et al.*<sup>257</sup>. L'APPI est particulièrement adaptée aux composés ayant un caractère hydrophobe prononcé. L'ionisation des analytes se fait par l'application d'un rayonnement UV produit par une lampe à décharge (Figure 35).

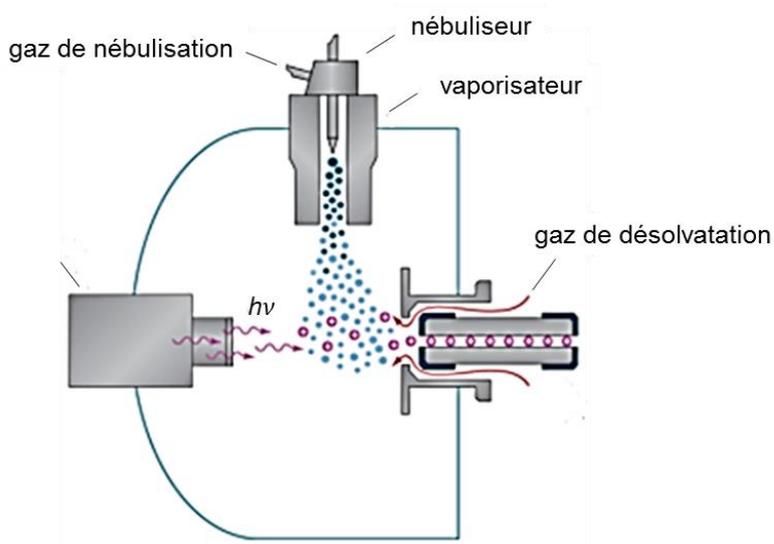
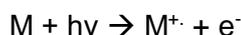
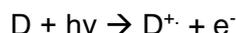


Figure 35 : Principe de la photoionisation à pression atmosphérique (d'après<sup>258</sup>)

Les molécules dont le potentiel d'ionisation est inférieur à l'énergie des photons générés par la lampe (10,03 et 10,64 eV dans le cas d'une lampe au krypton) peuvent être ionisées selon la réaction <sup>259</sup> :



Dans l'échantillon biologique, l'analyte n'est pas isolé mais solvato par des molécules de solvant potentiellement ionisables. Ainsi, l'ionisation directe de l'analyte dans le solvant ne peut se faire que si l'énergie d'ionisation de celui-ci est inférieur à l'énergie des photons et si l'énergie d'ionisation du solvant est supérieure à celle des photons <sup>259,260</sup>. Des solvants comme l'eau, l'acétonitrile et le méthanol ont des potentiels d'ionisation supérieurs à 10 eV et ne sont donc pas ionisables par les photons émis par une lampe au krypton. En revanche, des solvants comme l'éthanol ou l'isopropanol peuvent être ionisés et ainsi gêner l'ionisation des molécules d'intérêt. Pour maximiser les chances d'obtenir l'analyte ionisé, l'ajout d'un dopant peut être nécessaire. Ce dopant doit être présent en large excès et avoir un potentiel d'ionisation inférieur à celui des photons. La réaction de photoionisation du dopant a lieu selon la réaction <sup>259,261</sup> :



Par des réactions de transfert de charge (1) ou de transfert de proton (2), la molécule d'intérêt peut être ionisée sous forme  $M^{\cdot+}$  ou  $[M+H]^+$  <sup>260,262</sup>.



La réaction (1) a lieu si le potentiel d'ionisation de l'analyte est inférieur à celui du dopant. La réaction (2) peut se faire si l'affinité protonique de l'analyte est supérieure à celle du dopant. Généralement, la formation de l'espèce  $[M+H]^+$  est plus favorable que celle de l'espèce  $M^{\cdot+}$  car les analytes ne sont pas isolés en phase gazeuse mais sous forme de complexes de solvation. Néanmoins, selon la nature du solvant et du dopant, le radical cation peut parfois être majoritaire.

La formation d'anions nécessite l'ajout d'un dopant afin de générer des électrons thermiques. Si l'affinité électronique de l'analyte est suffisante, alors celui-ci peut capter un électron pour former l'espèce  $M^{\cdot-}$  <sup>263,264</sup>. L'utilisation de solvants chlorés permet également la formation d'adduit de type  $[M+Cl]^{\cdot-}$  par photodissociation <sup>265</sup>.

La source APPI est peu employée pour l'analyse de lipides. L'ESI reste la méthode d'ionisation la plus courante pour des analyses LC/MS. Cependant, quelques lipides n'étant

pas ou très mal ionisés en ESI, l'usage de l'APPI est requis. C'est le cas notamment de certains stéroïls et oxystéroïls tels que le cholestérol et le 7-céto-cholestérol.

### 3.2. Les analyseurs

L'analyseur de masse permet de séparer les ions, générés par la source d'ionisation, selon leur rapport  $m/z$ . Les valeurs de  $m/z$  des analytes chargés découlent d'un phénomène de déviation des ions par des champs électromagnétiques. Les caractéristiques d'un analyseur sont généralement décrites par leur pouvoir résolutif, leur précision en masse, leur gamme de masse, leur vitesse de balayage, leur sensibilité et leur compatibilité avec la source d'ionisation. Parmi ces paramètres, la résolution joue un rôle fondamental, notamment pour l'analyse lipidomique. La résolution est définie comme la capacité d'un instrument à distinguer entre eux deux signaux de masse différentes<sup>266,267</sup>. Plus la résolution est élevée, plus l'écart entre deux valeurs  $m/z$  que peut distinguer un appareil de spectrométrie de masse est petit et plus la mesure de masse est précise. La résolution dépend donc de la finesse des pics. Elle est définie par le rapport  $m/\Delta m$ , où  $m$  correspond à la masse de l'ion considéré. Suivant la définition retenue,  $\Delta m$  peut avoir deux sens différents. Si l'on considère le pouvoir séparatif,  $\Delta m$  correspond à la différence  $m/z$  minimale entre l'ion d'intérêt et son voisin de  $m/z$  le plus proche dont il peut être distingué. Si l'on se fonde sur la finesse des pics,  $\Delta m$  désigne la largeur à mi-hauteur du pic correspondant à l'analyte étudié<sup>267</sup>. En fonction de l'étude à réaliser et de la résolution souhaitée, différents analyseurs peuvent être utilisés. Les analyseurs diffèrent également suivant le principe utilisé pour mesurer les  $m/z$ , leur potentiel résolutif et l'étendue de leur gamme de masse. On distingue ainsi les analyseurs basse résolution, tels que les analyseurs quadripolaires et les pièges à ions, haute résolution, tels que les temps de vol et les secteurs magnétiques, et très haute résolution tels que les analyseurs orbitales ou à résonance cyclotronique. (Tableau 14). Certains appareils sont constitués de plusieurs analyseurs, on parle alors d'analyseur en tandem. L'utilisation de ce type d'instruments dont la sensibilité et la sélectivité est accrue offre des performances mises à profit pour l'élucidation structurale et la quantification. Dans le cadre d'une étude lipidomique, un appareil à haute résolution est nécessaire. Des instruments hybrides de type quadripôles-temps de vol (Q-TOF) sont souvent utilisés en raison de leurs performances en termes de résolution et de précision en masse.

Tableau 14 : Performances (indicatives) des différents analyseurs de masse (d'après<sup>268</sup>)

Analyseurs	Gamme de masse (m/z)	Résolution	Précision
Quadripôles	8 000	2 000	0,01 %
Trappe ionique	6 000	5 000-20 000	0,01 %
Temps de vol	> 10 <sup>6</sup>	20 000-60 000	0,02 %
Magnétique	20 000	20 000	< 0,001 %
Résonance cyclotronique	4 000	500 000-10 <sup>6</sup>	0,0005 %

### 3.2.1. Le quadripôle

Le quadripôle a été décrit pour la première fois par Paul et al. en 1953<sup>269</sup>. Il s'agit d'un analyseur à basse résolution constitué de quatre électrodes métalliques parfaitement parallèles, de sections hyperboliques ou circulaires et raccordées électriquement deux à deux (Figure 36). Son principe s'appuie sur la stabilité de trajectoire des ions dans un champ électrique oscillant. Cette stabilité dépend du rapport  $m/z$  et permet donc de séparer les ions sur ce paramètre. Pour cela, les électrodes sont soumises deux à deux à une différence de potentiel électrique (ddp) constituée d'une composante continue et d'une autre alternative. La polarité des électrodes s'inverse à une fréquence définie, ce qui confère un mouvement sinusoïdal aux ions. Lorsque les ions entrent en résonance, leur trajectoire est stable et ils peuvent atteindre le détecteur. En revanche, les ions qui n'entrent pas en résonance ont une trajectoire instable, heurtent les électrodes et se déchargent<sup>270</sup>. Ces ions ne sont alors pas détectés. Ainsi, lorsque l'on spécifie sur un intervalle de temps donné la valeur de ddp, le quadripôle ne détecte que les ions ayant un certain rapport  $m/z$ .

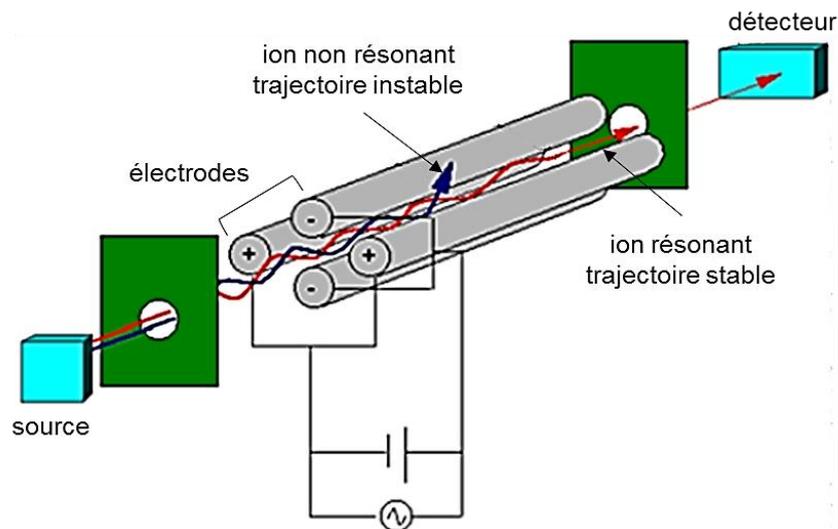


Figure 36 : Principe d'un analyseur quadripolaire (d'après <sup>268</sup>)

Les analyseurs quadripolaires jouent donc le rôle de « filtre » puisqu'ils permettent de sélectionner un ion à une valeur de  $m/z$  définie. Ils offrent, selon leur mode d'utilisation, une grande sensibilité permettant leur utilisation dans le cadre d'un dosage. En revanche, du fait de leur basse résolution, ils ne permettent pas une mesure précise des  $m/z$ .

### 3.2.2. L'analyseur à temps de vol

Les analyseurs à temps de vol (TOF) permettent la détermination précise du temps mis par un ion pour parcourir une distance définie, dans un tube sous vide poussé et libre de tout champ électrique ou magnétique. Le temps de parcours d'un ion est, alors, directement dépendant de la valeur de son  $m/z$  <sup>267,271</sup>. Ainsi, les ions de faible masse sont animés d'une grande vitesse et arrivent les premiers au détecteur, tandis que les ions plus lourds mettent plus de temps à traverser le tube. Les TOF linéaires, limités en termes de résolution, ont été équipés d'un réflectron afin d'améliorer leur performances <sup>272</sup>. En effet, dans un TOF linéaire, des ions de même rapport  $m/z$  peuvent avoir des énergies cinétiques initiales différentes, et donc un temps de vol différents. Ils n'arrivent, alors, pas en même temps au détecteur, limitant de ce fait la résolution. L'utilisation d'un système de réflectron permet d'augmenter les performances de ces analyseurs. Le réflectron est constitué d'électrodes circulaires jouant le rôle de miroir électrostatique. Il permet de focaliser simultanément les ions de même  $m/z$  mais d'énergie cinétique différente. Les ions d'énergie cinétique plus élevée pénètrent plus loin dans le réflectron, allongeant ainsi leur trajectoire et corrigeant la dispersion des temps d'arrivées au détecteur (Figure 37).

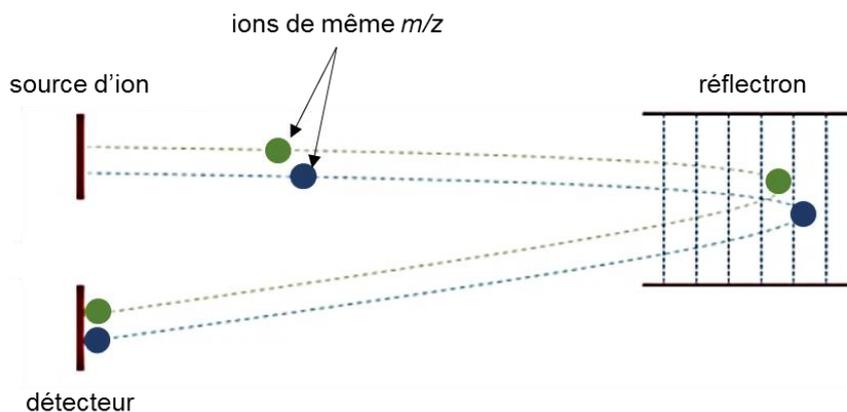


Figure 37 : Principe d'un analyseur à temps de vol équipé d'un réflectron (d'après <sup>273</sup>)

Ce type d'analyseurs offre une haute résolution sur une gamme de masse importante.

Les différents critères de performances spécifiques à chaque type d'analyseur ne peuvent être atteints par un seul type d'instrument. Cependant, l'utilisation de plusieurs analyseurs en tandem permet d'améliorer les performances globales de l'appareil. Ainsi, des analyseurs hybrides de type quadripôle-temps de vol peuvent-ils être utilisés pour combiner la sélectivité du quadripôle à la haute résolution du TOF.

### 3.2.3. L'hybride quadripôle-temps de vol

Les analyseurs de type Q-TOF sont constitués d'un quadripôle, d'une cellule de collision et d'un temps de vol (Figure 38) <sup>274,275</sup>. Le quadripôle sert de guide d'ion lorsqu'aucune fragmentation n'est nécessaire (MS simple). Il laisse alors passer tous les ions vers le TOF, sans qu'aucune fragmentation ne soit initiée dans la cellule de collision. Lors d'analyses plus ciblées, le quadripôle peut être utilisé afin de sélectionner un ou plusieurs ions précurseurs. Ces derniers sont alors fragmentés dans la cellule de collision, avant d'atteindre le TOF (MS/MS).

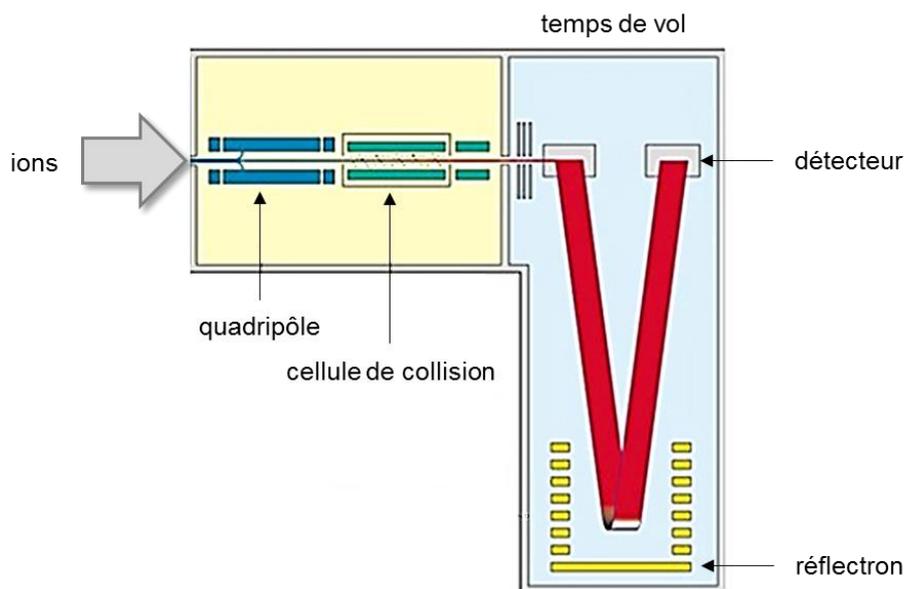


Figure 38 : Principe d'un analyseur hybride Q-TOF

Les analyseurs Q-TOF sont caractérisés par une très grande sensibilité, résolution et précision de masse. Ces performances, très importantes pour les études « omiques », font de ces analyseurs des instruments très utilisés en lipidomique.

#### 4. L'approche lipidomique

Comme nous l'avons vu précédemment, l'analyse lipidomique requière l'extraction et l'analyse des lipides. Cette analyse peut se faire selon deux approches distinctes. L'approche dite *shotgun*, ne nécessitant pas de système chromatographique, les lipides extraits sont directement injectés en spectrométrie de masse. L'approche CLASS (*Comprehensive Lipidomics Analysis by Separation Simplification*), quant à elle, est réalisée par couplage LC-MS<sup>276,277</sup>. Généralement, l'approche CLASS est préférée car elle offre l'avantage de réduire la complexité de l'échantillon, de diminuer l'effet de suppression d'ion et de fournir un premier niveau d'identification des lipides par la mesure du temps de rétention<sup>206</sup>.

Complémentaire à ces deux approches, différentes stratégies d'analyse en spectrométrie de masse peuvent être appliquées selon le but recherché : l'analyse globale, semi-globale et ciblée<sup>278,279</sup>.

##### 4.1. Analyse globale, semi-globale et ciblée

L'approche globale est employée afin de d'établir sans *a priori* la composition lipidique d'un échantillon biologique. L'analyseur de masse recense alors toutes les espèces lipidiques qu'il détecte<sup>279,280</sup>. Si un appareil de type Q-TOF est utilisé, le quadripôle sert uniquement comme

guide d'ions et aucune fragmentation n'a lieu dans la cellule de collision ; tous les ions sont donc analysés par le TOF. En raison du grand nombre d'espèces détectées par ce type d'approche, une quantification absolue des lipides n'est pas envisageable. Les études lipidomiques globales sont qualitatives ou semi-quantitatives et permettent une première approche exhaustive du lipidome des échantillons <sup>281</sup>.

L'approche semi-globale est utilisée pour détecter des classes spécifiques de lipides, voire des sous-classes <sup>282,283</sup>. Ces études sont effectuées par des expériences de MS/MS car c'est la fragmentation des lipides dans la cellule de collision qui génère des ions fragments spécifiques d'une classe ou sous-classe de lipides. Les différents glycérophospholipides peuvent être identifiés par cette approche car chacune des espèces de cette classe conduit, par fragmentation MS/MS, à des ions caractéristiques de la nature de la tête polaire <sup>282</sup>. Cette technique est sans *a priori* quant à la nature des espèces lipidiques d'une même classe présentes dans l'échantillon analysé, mais reste moins exhaustive que l'analyse par approche globale. Elle offre cependant une meilleure sensibilité.

Une approche ciblée est retenue lorsqu'est envisagée l'analyse d'espèces lipidiques données, dont l'intérêt et la structure ont été déterminés en amont <sup>284,285</sup>. Les instruments de type Q-TOF ne sont pas parfaits pour cette approche puisque seul l'ion précurseur peut être sélectionné au niveau du quadripôle. Des appareils tels qu'un triple quadripôle (QqQ) sont les plus usités car ils permettent de fonder l'analyse d'un composé sur une transition de masse entre un ion précurseur « ion parent » et un ou plusieurs de ses ions fragments « ions produits ». Les analyseurs QqQ offrent une grande sensibilité et permettent la quantification absolue des espèces étudiées.

Ces trois stratégies d'analyse présentent des avantages et des inconvénients propres à chacune d'entre elles. L'approche globale permet une vision complète du lipidome mais reste qualitative, tandis qu'à l'inverse, l'approche ciblée, très sensible, est utilisée pour quantifier des espèces lipidiques définies. Cette approche reste, cependant, très limitée en termes de nombre d'espèces étudiées lors d'une seule analyse. À mi-chemin, l'approche semi-globale offre un bon compromis.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, les options suivantes ont été retenues pour les différentes étapes de l'étude lipidomique. La majorité des lipides a été extraite des cellules placentaires par une extraction liquide-liquide, puis analysée en chromatographie liquide à polarité de phase inversée couplée à un spectromètre de masse de type Q-TOF. De plus, l'approche choisie est une étude globale du lipidome des cellules. Suite à aux résultats

obtenus, un intérêt particulier a été porté sur l'analyse des acides gras et notamment des eicosanoïdes. De plus, une analyse quantitative a été menée sur la famille des stérols.

## 4.2. *Design expérimental*

Afin d'éviter tout biais lors de l'interprétation des résultats, l'étude lipidomique doit suivre un certain nombre de règles, notamment du point de vue expérimental afin de s'assurer de la bonne qualité des analyses. Divers contrôles, témoignant de la qualité de l'analyse, sont utilisés : les contrôles qualité, les blancs d'extraction et les mélanges de standards lipidiques. L'ordre d'injection des échantillons et des contrôles est également un paramètre important à prendre en compte.

### 4.2.1. Les contrôles

Différents contrôles qualité sont utilisés : le QC 1/1, constitué d'un mélange équimoléculaire des échantillons biologiques, les QCs 1/3 et 1/6, correspondant à la dilution au tiers et au sixième du QC 1/1. Le QC 1/1, représentatif des échantillons étudiés, est utilisé à plusieurs fins. Il permet le conditionnement de la colonne chromatographique en début d'analyse pour assurer la reproductibilité du temps de rétention et de l'aire sous la courbe caractéristiques de chaque lipide détecté dans les échantillons<sup>286,287</sup>. L'ensemble des QCs (1/1, 1/3 et 1/6) servent aussi à vérifier, par la qualité de la relation linéaire entre intensité du signal et taux de dilution, la réalité physico-chimique du composé qu'il faut ou non associer aux signaux détectés par LC-MS<sup>288</sup>.

Les blancs d'extraction permettent d'établir la présence d'éventuelles impuretés introduites lors des différentes étapes de l'analyse. Il s'agit de témoins négatifs subissant rigoureusement les mêmes étapes d'extraction et d'analyse que les échantillons. Si des analytes sont retrouvés dans ces « témoins négatifs », ils ne proviennent pas des échantillons et ne doivent donc pas être pris en compte lors du retraitement des analyses.

Les mélanges de standards lipidiques sont composés d'espèces représentatives des différentes classes de lipides. Le profil chromatographique de ces mélanges étant connus, ils permettent de s'assurer de la bonne réalisation de l'analyse. En effet, ces mélanges sont injectés en début d'analyse afin de vérifier les temps de rétention et les aires des standards lipidiques. Ces mélanges standards sont également employés afin d'établir la relation entre le temps de rétention des lipides et leur ECN. De plus, la comparaison des profils entre un

mélange extraits dans les conditions de l'étude lipidomique et un mélange non extrait permet le calcul du rendement d'extraction <sup>286</sup>.

#### 4.2.2. L'ordre d'injection

Lorsqu'un grand nombre d'injections est réalisé en MS, l'intensité du signal tend à diminuer au cours du temps. Cette diminution est due à un phénomène d'encrassement au niveau de la source d'ionisation <sup>289-291</sup>. Ainsi, les échantillons injectés en début d'analyse peuvent présenter un profil d'intensité différent de ceux injectés plus tard. L'ordre d'injection peut, de ce fait, influencer et biaiser les résultats. Pour limiter ce phénomène, les échantillons ainsi que les QCs sont analysés à intervalle régulier et de manière à ce que l'ordre d'injection soit indépendant de la nature des échantillons.

### 4.3. *L'obtention de la matrice de données*

#### 4.3.1. Le prétraitement des données

À l'issue de l'analyse LC-MS, les données sont recueillies sous forme de chromatogrammes représentant l'intensité du courant ionique total (TIC) en fonction du temps de rétention. A chaque temps de rétention peut être assignée une série d'ions détectés à des  $m/z$  distincts, représentés sur des spectres de masse associés. Chaque ion, est caractérisé par trois paramètres : son temps de rétention ( $t_R$ ), son rapport  $m/z$  et l'intensité de son signal. La combinaison des valeurs de  $m/z$  et  $t_R$  permet l'identification de ces ions, alors appelés variables.

L'objectif d'une étude « omique » est d'identifier les variables dont l'intensité est significativement différente entre deux groupes d'échantillons. Pour ce faire, un maximum d'informations doit pouvoir être extrait à partir des chromatogrammes et des spectres de masse. À cette fin, un prétraitement des données est effectué à l'aide de logiciels spécifiques dans le but de recenser par leur  $t_R$  et leur  $m/z$  le plus de variables possible tout en déterminant pour chacune d'entre elles leur intensité dans chaque échantillon. Dans notre cas cette procédure a été effectuée à l'aide du logiciel XCMS, qui réalise le retraitement des données en quatre étapes : filtration et détection des pics, appariement, correction des  $t_R$  et intégration <sup>292,293</sup>(Figure 39).

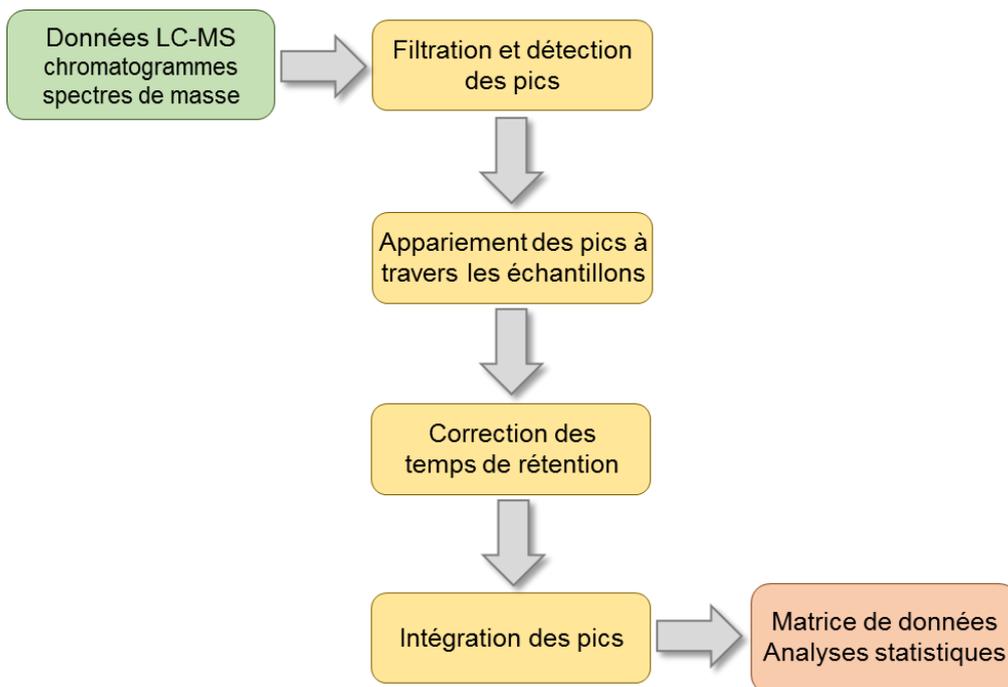


Figure 39 : Étapes du prétraitement des données LC-MS à l'aide du logiciel XCMS

La première étape consiste à définir les régions, dites d'intérêt, chaque région correspondant à l'intervalle de déviation de  $m/z$  sur des spectres successifs qui est inférieure à l'erreur sur la mesure des  $m/z$ <sup>292,294</sup>(Figure 40). Cette erreur est un paramètre défini par l'utilisateur selon les performances du spectromètre de masse. Dans le cadre d'analyses lipidomiques, les appareils utilisés permettent généralement une erreur sur la valeur  $m/z$  de l'ordre de 10 à 30 ppm.

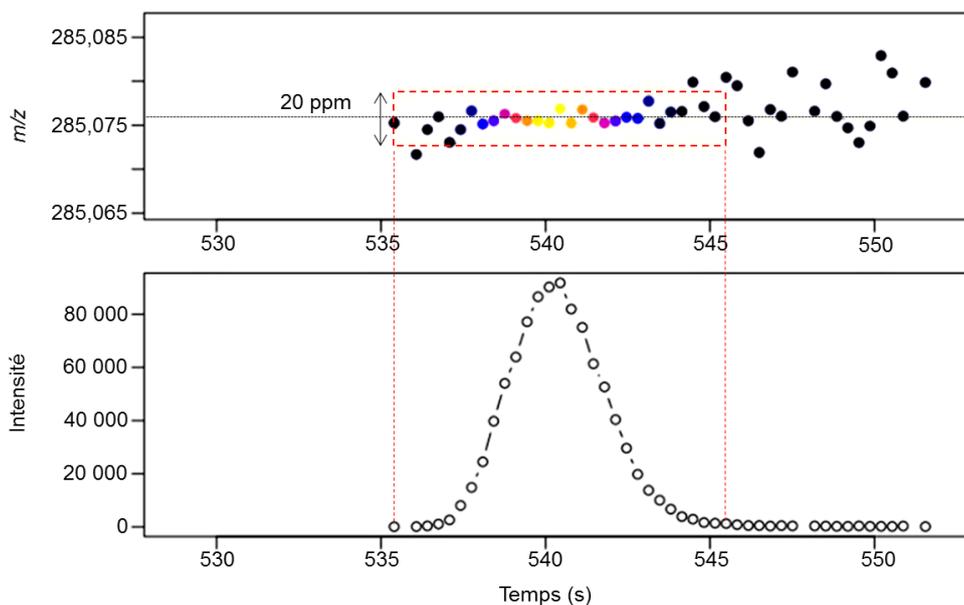


Figure 40 : Principe de la détection des régions d'intérêt (d'après <sup>294</sup>)  
 La région d'intérêt représente les signaux successifs dont le rapport  $m/z$  varie de moins de 20 ppm. Une transformée en ondelettes continues permet de constituer le pic chromatographique correspondant.

Une fois l'ensemble des pics d'intérêt détectés pour chaque échantillon, une étape d'appariement permet de regrouper tous les pics correspondant à une même variable à travers tous les échantillons. L'algorithme utilisé par défaut tient compte des  $t_R$  et des  $m/z$  pour appairier les pics <sup>295</sup>. Ces derniers sont regroupés dans un intervalle de valeur de  $m/z$  défini par l'utilisateur. Les groupes de pics alors déterminés sont ensuite différenciés selon leur  $t_R$ . L'intervalle de  $t_R$  est défini par l'algorithme en identifiant des régions contenant de nombreux pics ayant des  $t_R$  similaires <sup>292</sup>.

Au cours des injections une légère déviation des  $t_R$  peut être observée <sup>293</sup>. Un réalignement des pics chromatographiques est nécessaire afin de corriger cet écart. L'algorithme utilisé par défaut par XCMS met en jeu une méthode de calcul de la corrélation existant entre les chromatogrammes afin d'estimer leur similitude <sup>296,297</sup>. Pour une forte corrélation, la déviation des  $t_R$  est corrigée. Suite au réalignement des pics, une nouvelle étape d'appariement peut avoir lieu.

D'une manière générale, un pic détecté est considéré comme une variable s'il a été retrouvé dans au moins 40 % des échantillons. Une fois toutes les variables détectées, appariées et réalignées, celles-ci sont intégrées afin de déterminer leurs intensités dans chaque échantillon. À la fin des étapes de prétraitement, les données sont regroupées sous forme d'une matrice représentant l'ensemble des variables intégrées et leurs intensités respectives pour tous les échantillons (Figure 41).

		Ensemble des échantillons			
		Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	...
Ensemble des variables	Variable 1	Intensité 1,1	Intensité 1,2	Intensité 1,3	Intensité 1,...
	Variable 2	Intensité 2,1	Intensité 2,2	Intensité 2,3	Intensité 2,...
	Variable 3	Intensité 3,1	Intensité 3,2	Intensité 3,3	Intensité 3,...
	Variable 4	Intensité 4,1	Intensité 4,2	Intensité 4,3	Intensité 4,...
	Variable 5	Intensité 5,1	Intensité 5,2	Intensité 5,3	Intensité 5,...
	...	Intensité ...,1	Intensité ...,2	Intensité ...,3	Intensité .....

Figure 41 : Matrice de données constituée de l'ensemble des variables intégrées et de leurs intensités dans chaque échantillon

### 4.3.2. La normalisation des données

Réussir à extraire l'information pertinente en comparant des groupes d'échantillons biologiques peut être complexe, notamment en raison de l'existence d'une variabilité d'origine biologique non contrôlée et/ou analytique. La recherche de variables discriminantes entre deux groupes d'échantillons biologiques ne peut se faire que si ces derniers sont comparables entre eux. Ainsi, afin de faire ressortir la variabilité biologique pertinente, les sources systématiques de variabilité non pertinente doivent être atténuées au maximum. Pour ce faire, différentes étapes de normalisations peuvent être employées.

#### 4.3.2.1. La normalisation inter-échantillons

La source majeure de variabilité analytique inter-échantillons provient de l'encrassement de la source d'ionisation. Le QC 1/1, injecté régulièrement au cours de la cession d'analyse des échantillons, est utilisé afin de corriger la fluctuation du signal liée à l'encrassement de la source. Différentes méthodes existent, notamment la régression linéaire et la régression locale ou loess (*low order non linear locally estimated smoothing*)<sup>286,298</sup>. La régression locale est, généralement, préférée à la régression linéaire car elle modélise mieux la variation au cours du temps du signal liée à l'encrassement de la source. En effet, la régression linéaire considère que la variation du signal peut être décrite par un modèle linéaire, ce qui est loin d'être toujours le cas. Dans le cas de la régression locale, ces fluctuations sont prises en compte. Une régression polynomiale d'ordre multiple est appliquée entre chaque injection du QC 1/1, *i.e.* localement. Une courbe de tendance de la fluctuation du signal du QC 1/1 est tracée en fonction de l'ordre d'injection. Une extrapolation est ensuite réalisée sur l'ensemble des échantillons selon leur ordre d'injection.

#### 4.3.2.2. La normalisation intra-échantillon

Afin de faire ressortir l'information biologique induite par le phénomène étudié, différentes étapes de normalisation intra-échantillon sont nécessaires. L'objectif de ces normalisations est de diminuer l'influence du bruit de fond, au profit de celle des variables d'intérêts. En spectrométrie de masse, l'intensité du signal d'un analyte dépend de sa capacité à s'ioniser. Or, d'un point de vue biologique, les espèces peu abondantes sont tout aussi intéressantes que les espèces très abondantes. De plus, en spectrométrie de masse, plus l'intensité augmente, plus l'écart-type des intensités augmente, traduisant un phénomène d'hétéroscédasticité. Afin de minimiser ces différences d'ordre de grandeur entre les abondances relatives des différents métabolites, les données sont normalisées selon trois étapes : une transformation, un centrage et un redimensionnement.

Les phénomènes d'hétéroscédasticité sont corrigés et la distribution des intensités est rendue plus symétrique grâce à la transformation des données par leur logarithme décimal ( $\log_{10}$ ). Cette transformation permet également de réduire les différences d'intensités entre les variables et l'influence des variables aberrantes.

Le centrage des données vise à répartir symétriquement les variables autour de 0 ou de 1. Le centrage à la moyenne est appliqué en divisant les intensités d'une variable par leur moyenne ; celles-ci sont alors réparties autour de 0. Le centrage à la médiane permet, quant à lui, de centrer symétriquement les valeurs sur 1. Cette étape tend à se focaliser sur les différences existant entre les échantillons plutôt que sur leurs similitudes <sup>299</sup>.

L'étape de redimensionnement des données consiste à diviser chacune des variables par un facteur unique afin de diminuer l'amplitude de variation des intensités. Ainsi, les variables de forte intensité ne sont pas considérées de manière excessive dans le modèle. Le redimensionnement peut se faire selon différentes méthodes, notamment par la méthode Pareto. Le redimensionnement Pareto est généralement utilisé car il permet de diminuer l'importance relative des variables de forte intensité et d'augmenter celle des variables peu intenses, tout en conservant la hiérarchisation des variables en fonction de leur intensité <sup>300,301</sup>. Cette méthode utilise la racine carrée de l'écart-type de chaque variable comme facteur de redimensionnement. L'avantage de la méthode Pareto repose sur le fait que le profil initial des données est conservée au maximum, à l'inverse de certaines autres méthodes de redimensionnement <sup>300</sup>.

### 4.3.3. La filtration des données

L'étape de filtration des données a pour but d'éliminer les variables assimilées à du bruit de fond, *i.e.* n'ayant pas de signification physico-chimique. Ces variables sont caractérisées par un manque de stabilité et de corrélation au cours des injections. Ainsi, deux paramètres sont calculés à l'aide de l'ensemble des QCs. Dans un premier temps, le QC 1/1, représentatif de l'ensemble des échantillons, est utilisé afin de déterminer le coefficient de variation (CV) de l'intensité des variables. La valeur seuil de CV recommandée par l'autorité de régulation américaine (FDA) pour la recherche de biomarqueurs est de 30 %<sup>287,302</sup>. Ainsi, les variables dont le CV est supérieur à cette valeur sont éliminées de la matrice de données. Le coefficient de corrélation ( $r$ ) permet, quant à lui, de s'assurer de la corrélation entre l'intensité du signal des variables et le taux de dilution des QCs 1/1, 1/3 et 1/6. Les variables dont le coefficient de corrélation est inférieur à 0,7 sont considérées comme non corrélées, donc aberrantes et sont supprimées de la matrice<sup>289</sup>.

À l'issue des différentes étapes de prétraitement, de normalisation et de filtration, la matrice finale de données est obtenue. Des analyses statistiques peuvent alors être effectuées afin de rechercher la présence de variables discriminantes entre deux ou plusieurs groupes d'échantillons biologiques.

### 4.4. Les analyses statistiques multivariées

Les analyses statistiques multivariées sont des approches chimiométriques permettant d'explorer un grand nombre de données à partir de nombreux échantillons. Ces approches considèrent l'ensemble des variables dans leur globalité, *i.e.* les variables sont considérées comme dépendantes les unes des autres et leurs interactions sont prises en compte. Ce type d'approche statistique est particulièrement intéressant dans le cadre d'analyses lipidomiques puisqu'il permet de comparer les profils lipidiques d'échantillons biologiques et de mettre en évidence les métabolites discriminants. Les analyses multivariées sont regroupées en deux catégories : les analyses supervisées et les analyses non supervisées. Le choix de la méthode utilisée dépend du type d'informations souhaitées. En effet, les analyses non supervisées sont descriptives alors que les analyses supervisées sont prédictives.

#### 4.4.1. Les analyses non supervisées

##### 4.4.1.1. Principe

Les analyses non supervisées sont des approches qualitatives utilisées pour l'étude de données sans *a priori* quant à la répartition des échantillons en classe. Seule la variabilité observée est considérée pour rechercher des groupes à l'intérieur d'un ensemble d'échantillons. Ces méthodes utilisent généralement des représentations graphiques, ainsi les tendances naturelles de regroupement des échantillons sont évaluées visuellement. Parmi les méthodes non supervisées, l'analyse en composantes principales (PCA) est généralement la plus utilisée lors d'études d'un grand nombre de données biologiques. La PCA permet de réduire la dimension de la matrice de données  $X$  en la décomposant en une combinaison d'autres matrices : la matrice des *scores*  $T$  relative aux échantillons, la matrice des *loadings*  $P$  relative aux variables et la matrice des résidus  $E$ . Cette décomposition est réalisée afin d'obtenir  $X = T \times P + E$  (Figure 42) <sup>303,304</sup>.

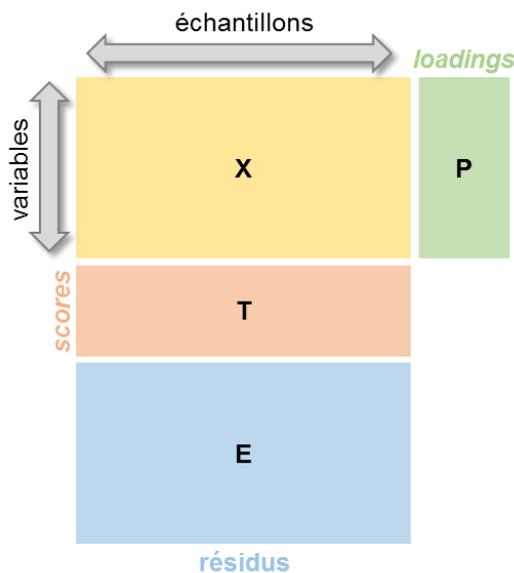


Figure 42 : Décomposition de la matrice de données  $X$  lors d'une analyse en composantes principales

La PCA permet de définir des structures à l'intérieur des données par construction de composantes principales. Ces composantes correspondent à des combinaisons linéaires des variables initiales et décrivent les sources de variance entre les échantillons <sup>305</sup>. Elles sont calculées afin de minimiser l'erreur résiduelle tout en extrayant le plus de variance possible. Les deux premières composantes représentent ainsi les directions de plus grande variation entre les échantillons. D'autres composantes peuvent être prises en compte si leur ajout est bénéfique à la construction du modèle statistique. Une fois le nombre de composantes défini,

les échantillons sont projetés dans un espace tridimensionnel : le *score plot* (Figure 43). Cette représentation graphique permet de visualiser les directions de plus grande dispersion des échantillons <sup>303,306</sup>. Les variables peuvent également être projetées dans cet espace (*loading plot*) afin d'identifier celles à l'origine de la répartition des échantillons (Figure 43).

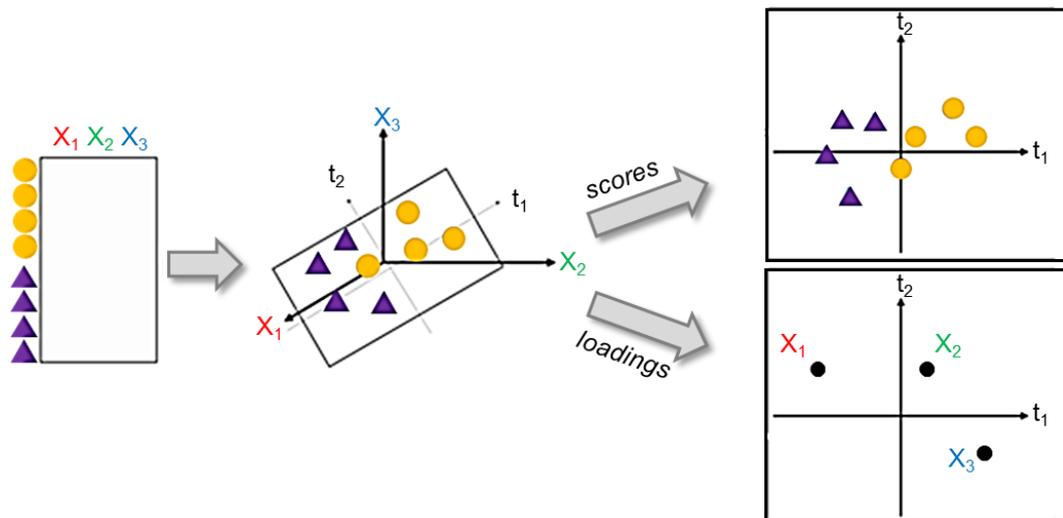


Figure 43 : Principe de construction et de représentation d'une analyse en composantes principale

#### 4.4.1.2. Évaluation des performances

Le choix du nombre de composantes retenues lors de la création d'un modèle en PCA est très important et conditionne la qualité du modèle statistique développé. Afin de déterminer le nombre optimal de composantes, le degré d'ajustement du modèle aux données et son pouvoir prédictifs doivent être pris en compte. Ces deux facteurs peuvent être estimés par les valeurs des paramètres  $R^2$  et  $Q^2$  traduisant, respectivement, la part de variabilité expliquée et le pouvoir prédictif du modèle. Ces paramètres sont déterminés par validation croisée, c'est-à-dire, en construisant un modèle sur une partie des données initiales et en utilisant ce modèle pour prédire les données restantes <sup>307</sup>. Ces données sont ensuite comparées avec les valeurs réelles afin d'évaluer les performances du modèle. Ainsi, plus les valeurs de  $R^2$  et  $Q^2$  sont élevées (tendent vers 1), plus le modèle est explicatif et prédictif.

La PCA est une approche non supervisée permettant de visualiser la tendance naturelle de regroupement des échantillons <sup>308</sup>. Cette méthode reste cependant uniquement descriptive et n'est pas suffisante pour construire un modèle statistique permettant d'extraire des variables discriminantes entre deux groupes d'échantillons.

#### 4.4.2. Les analyses supervisées

Les analyses statistiques supervisées sont des méthodes explicatives et prédictives. Elles ne considèrent plus les échantillons sans *a priori* mais selon leur appartenance à une classe définie par l'utilisateur. Une matrice des classes Y est construite à partir de la matrice de données X par attribution d'une classe d'appartenance aux échantillons<sup>305,306</sup>. L'objectif final d'une étude lipidomique étant de discriminer différents groupes d'échantillons biologiques selon leur profil lipidique, les analyses supervisées s'imposent comme les méthodes les plus appropriées à ces études.

##### 4.4.2.1. L'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels

###### 4.4.2.1.1. Principe

Le principe de l'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels (PLS-DA) est fondé sur la maximisation de la covariance entre la matrice de données X et la matrice des classes Y. Un modèle statistique est alors construit par rotation de la projection dans l'espace afin d'obtenir des composantes principales concentrées sur la discrimination des classes d'appartenance.<sup>309,310</sup> Ce modèle permet d'obtenir la séparation maximale entre les groupes d'échantillons sur la base des variables contenues dans la matrice de données X. Tout comme en PCA, la répartition des échantillons est visualisée sur un *score plot* et celle des variables sur un *loading plot*.

###### 4.4.2.1.2. Évaluation des performances

En PLS-DA, la détermination du nombre de composantes se fait selon la même méthode de validation croisée qu'en PCA. Les paramètres  $R^2$  et  $Q^2$  traduisent alors les capacités explicatives et prédictives du modèle généré. Lors d'analyses supervisées, un phénomène de sur-apprentissage peut survenir dans la construction du modèle. Le modèle capte alors de l'information à partir des données du bruit de fond. Les valeurs de  $Q^2$  ne reflètent plus le véritable caractère prédictif du modèle. Afin de pouvoir interpréter correctement les résultats de la PLS-DA, les modèles doivent donc être rigoureusement validés.

Une première manière de valider un modèle construit par PLS-DA est le test de l'analyse de la variance des résidus prédictifs de la validation croisée (CV-ANOVA). Ce test est utilisé afin d'évaluer la significativité statistique du pouvoir prédictif du modèle<sup>311</sup>. Un test d'hypothèse nulle (les échantillons appartiennent à la même classe) est réalisé sur les résidus issus de la validation croisée. La *p-value* associée à un test de Fisher obtenue permet de

rejeter, ou non l'hypothèse nulle. Une  $p$ -value inférieure au risque  $\alpha$  (1 % ou 5 %) induit le rejet de l'hypothèse nulle ; les échantillons n'appartiennent donc pas à la même classe et la significativité du modèle est validé.

Afin de s'assurer qu'aucun phénomène de sur-apprentissage n'a eu lieu durant la construction du modèle statistique, un test de permutation peut être effectué (Figure 44). Ce test se base sur la réaffectation aléatoire des valeurs de la matrice des classes  $Y$  tout en gardant fixe la matrice des données  $X$  <sup>312</sup>. Ainsi, les classes des échantillons sont permutées de façon aléatoire et un modèle est généré pour chaque permutation (généralement entre 100 et 1 000). Les nouveaux paramètres  $R^2$  et  $Q^2$  sont recalculés par validation croisée et leur distribution est comparée aux valeurs du modèle évalué <sup>311</sup>. Ce modèle est validé si ses valeurs de  $R^2$  et  $Q^2$  sont supérieures à toutes celles calculées pour les modèles permutés <sup>313</sup>.

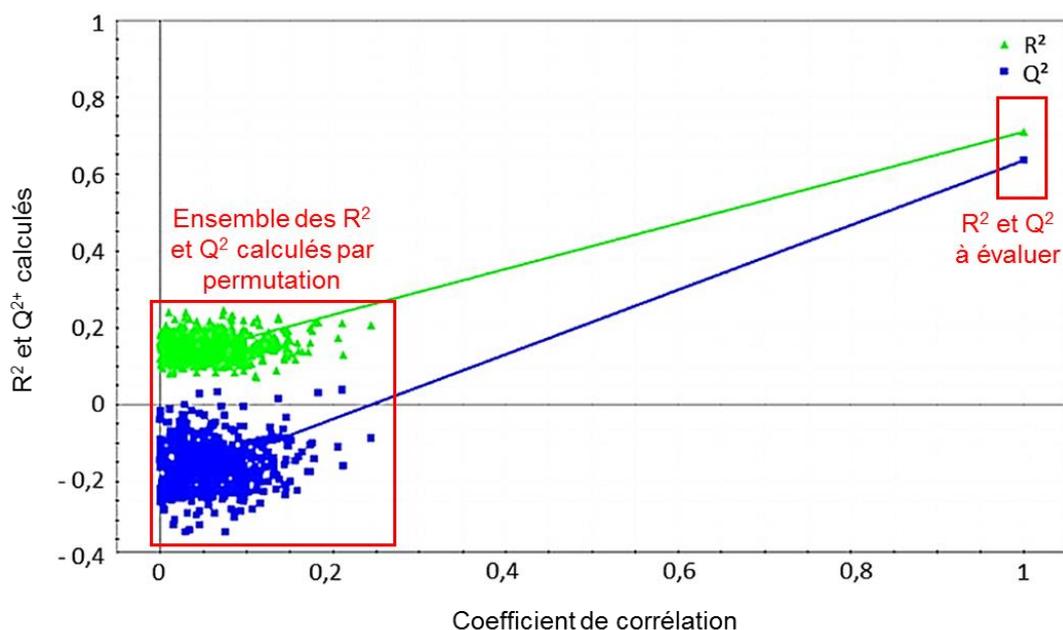


Figure 44 : Représentation graphique d'un test de permutation

Le test CV-ANOVA ainsi que le test de permutation sont des méthodes de validation interne qui estiment raisonnablement la capacité prédictive d'un modèle statistique. Cependant, une validation externe, plus rigoureuse, peut être réalisée afin de valider un modèle généré en PLS-DA <sup>314</sup>. Cette procédure consiste à prédire l'appartenance à une classe d'échantillons n'ayant pas servi à construire le modèle statistique. Ainsi, les échantillons sont répartis selon deux groupes : le groupe d'apprentissage et le groupe test. Le groupe d'apprentissage, représentant généralement 80 % des échantillons, permet de créer le

modèle, puis le groupe test (20 % restants) est utilisé pour évaluer son pouvoir prédictif. La performance globale du modèle est estimée par le pourcentage de prédictions justes.

#### 4.4.2.2. L'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels orthogonale

##### 4.4.2.2.1. Principe

L'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels orthogonale (OPLS-DA) est une variante de la PLS-DA qui divise la variabilité présente dans la matrice de données  $X$  en deux parties : une partie prédictive, représentée par la première composante, linéairement reliée à la matrice des classes  $Y$  et une partie orthogonale, représentée par la seconde composante, non reliée à la matrice  $Y$  <sup>315</sup>. Ainsi, la variabilité pertinente entre les échantillons est concentrée sur la première composante tandis que toute la variabilité non liée à la discrimination des groupes d'échantillons est placée sur la seconde composante orthogonale. D'un point de vue géométrique, l'OPLS-DA est réalisée par rotation de l'espace du référentiel de la PLS-DA (Figure 45). Cette approche permet de simplifier l'interprétation des modèles et d'extraire plus facilement les variables discriminantes. <sup>316</sup>

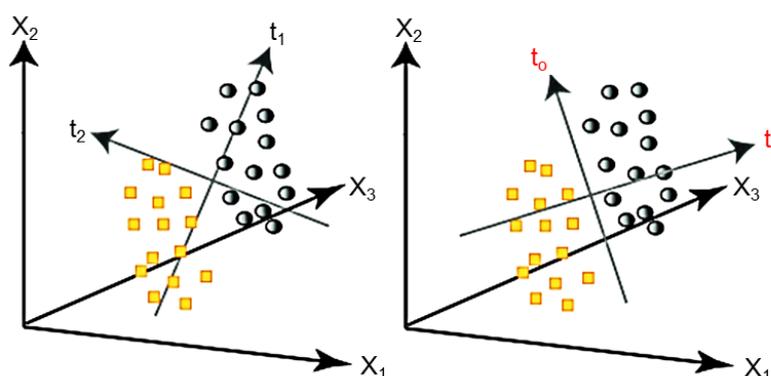


Figure 45 : Illustration géométrique du changement de référentiel entre la PLS-DA et l'OPLS-DA (d'après <sup>316</sup>)  
 $t_1$  et  $t_2$  correspondent aux composantes principales,  $t_p$  à la composante prédictive et  $t_0$  à la composante orthogonale. Les échantillons des différentes classes sont représentés par les carrés jaunes et les ronds noirs.

À l'instar de la PCA et de la PLS-DA, la visualisation des échantillons et des variables peut se faire sur le *score plot* et le *loading plot*. De plus, la génération d'une représentation *S-plot* permet la visualisation de l'influence des variables sur la séparation des groupes d'échantillons (Figure 46). Cette représentation graphique, en forme de S, décrit la covariance et la corrélation entre les variables et les scores prédictifs, soit l'influence et la fiabilité des variables dans le modèle. Ainsi, les variables aux extrémités du S traduisent une forte contribution et une grande fiabilité dans la construction du modèle et sont donc les variables les plus

impliquées dans la discrimination des échantillons. Un autre paramètre, le score VIP (*Variable Importance in the Projection*), peut être pris en compte. Il reflète l'importance de chacune des variables dans la séparation des classes <sup>305</sup>. La contribution relative d'une variable dans la discrimination des classes est considérée significative pour un score VIP supérieur ou égal à 1.

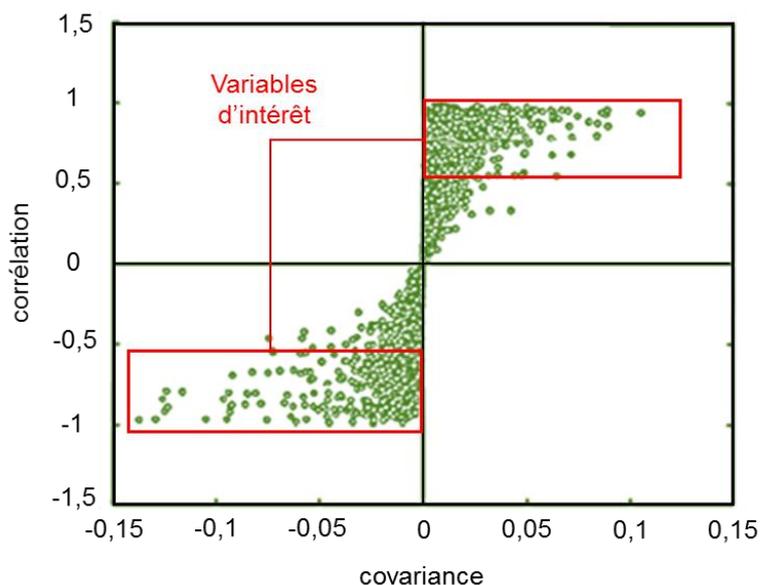


Figure 46 : Représentation *S-plot* d'un modèle généré en OPLS-DA (d'après <sup>317</sup>)

#### 4.4.2.2. Évaluation des performances

Les performances d'un modèle construit par OPLS-DA peuvent être estimées de la même manière que pour les modèles générés en PLS-DA. Seul le test de permutation ne peut être réalisé en OPLS-DA. La validation des modèles est donc effectuée par le test CV-ANOVA et par validation externe.

#### 4.4.2.3. L'analyse par machine à vecteurs de support

##### 4.4.2.3.1. Principe

L'analyse par machine à vecteurs de support (SVM) est un type d'apprentissage automatique permettant la classification d'un échantillon inconnu dans une classe prédéfinie par un algorithme de classification <sup>313,318,319</sup>. Le but de ce type d'analyse est de classer les données en maximisant la marge entre les classes d'échantillon dans un espace à haute dimension (Figure 47) <sup>320</sup>. L'algorithme optimal est développé à l'aide d'une phase d'apprentissage, dans laquelle les données sont utilisées pour développer un algorithme

capable de discriminer les échantillons selon leur classe, et d'une phase test dans laquelle l'algorithme est utilisé pour prédire la classe d'appartenance d'un échantillon inconnu<sup>318,321</sup>. La phase d'apprentissage est généralement réalisée sur 80 % des données et la phase test sur les 20 % restants. La phase d'apprentissage a pour but d'estimer la « fonction de décision » ou « hyperplan » permettant la meilleure séparation entre les classes d'échantillons. Différents plans peuvent conduire à une séparation entre les classes d'échantillons, cependant, la séparation optimale est obtenue lorsque la marge séparant deux vecteurs de support, *i.e.* deux échantillons les plus proches spatialement et de classes différentes, est la plus large possible (Figure 47)<sup>318,321</sup>.

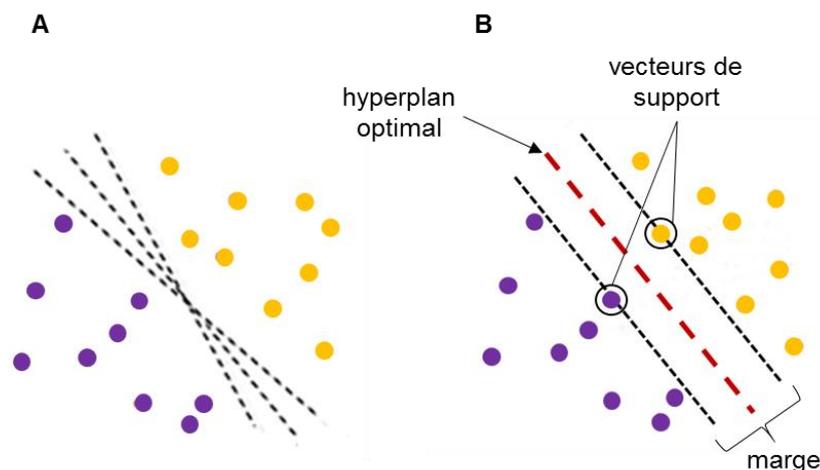


Figure 47 : Représentation de classification par SVM (d'après<sup>318</sup>)  
A : différents plans possible conduisant à la séparation des classes  
B : plan optimal de séparation des classes

#### 4.4.2.3.2. Évaluation des performances

Les performances d'un algorithme peuvent être évaluées par sa sensibilité, sa spécificité et son exactitude. La sensibilité reflète la proportion de vrais positifs correctement identifiés tandis que la spécificité référence la proportion de vrais négatifs correctement identifiés. L'exactitude représente, quant à elle, la proportion globale de classification correcte. Cette dernière est évaluée par répétition de la procédure de classification, *i.e.* en permutant aléatoirement les échantillons de la phase d'apprentissage jusqu'à générer une distribution nulle de l'exactitude<sup>318</sup>. La spécificité et la sensibilité de l'algorithme sont évaluées par la construction d'une représentation graphique : la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*)<sup>322,323</sup>. Le taux de faux positifs est reporté en abscisse (1-spécificité) et le taux de vrai positifs en ordonné (sensibilité) (Figure 48). La performance de l'algorithme est alors déterminée par le calcul de l'aire sous la courbe (AUC)<sup>324,325</sup>. Une valeur d'AUC à 0,5 traduit une probabilité de faux positifs de 50 %, soit un apport nul. Une AUC à 1, en revanche,

correspond à une probabilité de vrais positifs de 100 %, *i.e.* les échantillons sont classés correctement dans 100 % des cas. Généralement une AUC est considérée bonne à partir de 0,7.

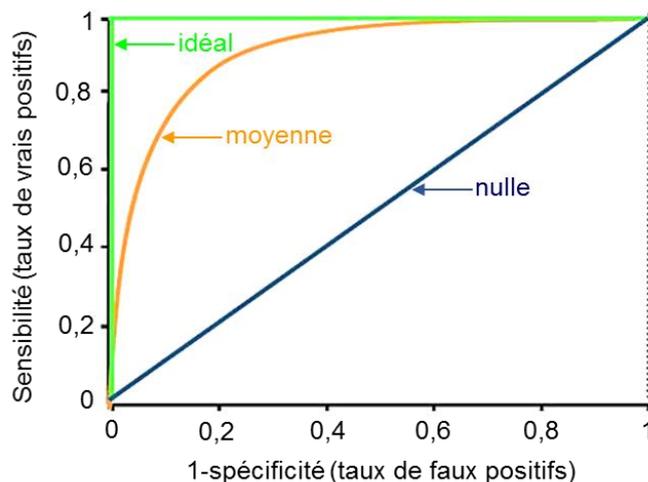


Figure 48 : Représentation graphique d'une courbe ROC selon différentes valeurs d'AUC

Lors d'une analyse lipidomique, l'objectif étant d'identifier les variables permettant de discriminer deux groupes d'échantillons selon leur classe d'appartenance, les analyses statistiques supervisées sont les plus adaptées. Les performances des modèles créés en PLS-DA, OPLS-DA et SVM sont évaluées et ces derniers sont ensuite validés afin de s'assurer que les variables discriminantes reflètent bien le phénomène étudié. Par la suite, un test statistique univarié permet de confirmer ces variables avant leur identification en vue de déceler de potentiels marqueurs lipidiques.

#### 4.5. Analyses statistiques univariées

À l'inverse des analyses multivariées, les analyses univariées considèrent les variables indépendamment les unes des autres. Ainsi, les comparaisons entre les classes se font par variables et non pas sur l'ensemble des variables. Différents tests existent et, généralement, le test de Wilcoxon (Mann-Whitney), non paramétrique, est préféré dans le cas d'analyses « omiques »<sup>326</sup>. L'hypothèse nulle à tester considère que la distribution des données est la même dans les deux classes. Le risque de rejet  $\alpha$  est fixé, généralement, à 5 %. Cependant, lors de comparaisons multiples, le risque  $\alpha$  est considérablement augmenté. Dans ce cas, les *p-values* calculées doivent être ajustées par une correction FDR (*False Discovery Rate*)<sup>327</sup>. Les *p-values* corrigées, notées *q-values*, estiment alors le taux de faux positifs à un risque  $\alpha$  de 5 %. Une variable dont la valeur de *q-value* est inférieure au seuil  $\alpha$  est alors considérée

significativement différente entre les deux groupes d'échantillons, avec une confiance suffisante.

Ainsi, à l'issu des analyses statistiques multivariées, un certain nombre de variables peuvent être considérées discriminantes entre les groupes d'échantillons. Un test univarié de type Wilcoxon associé à une correction FDR permet de s'assurer que l'intensité de chacune des variables sélectionnées est bien significativement différente entre les groupes d'échantillons. Ces variables sont alors identifiées afin de déterminer de potentiels biomarqueurs lipidiques.

#### 4.6. *L'identification des lipides*

La structure exacte des lipides est difficile à déterminer et ne peut se faire que par des études de fragmentation. Généralement les lipides sont annotés, c'est-à-dire caractérisés par leur sous-classe (TG, DG, PE, PS, etc.)<sup>328</sup>. L'annotation des variables discriminantes extraites des analyses statistiques multivariées et univariées se fait selon deux critères : la précision du rapport  $m/z$  et du  $t_R$ .

L'utilisation de bases de données référencées telles que METLIN et LIPID MAPS permet une première annotation des variables selon leur  $m/z$ <sup>329,330</sup>. Une erreur de 5 à 10 ppm est tolérée et l'ensemble des adduits possibles est recherché (sodium, potassium, ammonium, chlorure, etc.). En effet, les lipides peuvent exister sous forme de différents adduits, pouvant être spécifiques selon la sous-classe de lipides. Par ailleurs, l'étude des spectres de masse des variables permet d'éviter une fausse annotation due à la présence d'isotopes.

À la suite de l'interrogation des bases de données, les variables, alors annotées comme lipides, sont confirmées ou infirmées selon l'étude de leur temps de rétention. La corrélation entre le  $t_R$  d'un lipide et son ECN permet le calcul d'un  $t_R$  théorique, alors comparé au  $t_R$  expérimental. Une erreur de 15 % est tolérée ; ainsi pour un écart inférieur à 15 % le lipide annoté selon le  $m/z$  est confirmé. À l'inverse, une erreur supérieure à 15 % sur le  $t_R$  infirme l'annotation précédente et la variable est exclue.

À l'issu de l'annotation, une variable correspondant à un lipide est caractérisée par sa sous-classe, son nombre de carbones global sur les chaînes d'acides gras et son nombre d'insaturations. En revanche, le nombre de carbones et d'insaturations de chacune des chaînes d'acide gras ne peut être déterminé. Par exemple, un PE contenant 34 carbones et une insaturation est noté PE(34:1) mais peut correspondre à un PE(16:0/18:1), PE(16:1/18:0), PE(14:0/20:1), etc. Seule une étude plus poussée par fragmentation peut permettre de distinguer les différentes possibilités.

Le placenta humain peut être la cible de différents toxiques pouvant mener à un mauvais développement de ce dernier et à des complications de la grossesse et de la croissance fœtale. Ces toxiques peuvent atteindre le fœtus par passage de la barrière placentaire mais également agir sur le placenta lui-même. Parmi ces contaminants, un phtalate, le MEHP, est un perturbateur endocrinien, toxique pour la reproduction et ligand exogène du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Au niveau du placenta, PPAR $\gamma$  joue un rôle très important dans la différenciation et l'invasion des trophoblastes et dans le métabolisme lipidique. De fait, l'interaction du MEHP avec PPAR $\gamma$  mène à l'activation du récepteur et à la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique placentaire. Pour vérifier cette hypothèse, des cellules placentaires ont été incubées en présence de MEHP afin de rechercher d'éventuelles perturbations de leur lipidome. Ainsi, l'étude des différentes classes lipidiques que sont les glycérolipides, les glycérophospholipides, les acides gras et les sphingolipides a été menée par une analyse lipidomique globale sur la lignée cellulaire placentaire JEG-3 incubée ou non en présence de MEHP. Les eicosanoïdes et les stéroïdes ont également été étudiés par des analyses plus ciblées. De plus, le contrôle de la dose utilisée lors de l'incubation de ces cellules a été effectué par une méthode de quantification du MEHP mise au point durant ma thèse et utilisée pour doser le MEHP dans le milieu d'incubation, dans les culots cellulaires et dans des villosités placentaires. Suite aux résultats obtenus sur la lignée cellulaire, une étude transcriptomique a été menée afin de déceler une éventuelle perturbation des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique des cellules JEG-3. Enfin, une étude lipidomique globale a été réalisée sur des cultures primaires de trophoblastes incubées ou non en présence de MEHP.



# Culture cellulaire

En vue d'évaluer l'effet potentiel du MEHP sur le lipidome des cellules placentaires une première étude a été menée sur la lignée cellulaire JEG-3. Ces cellules, issues de choriocarcinomes, présentent l'avantage d'être immortelles, simple à obtenir et à cultiver. Par la suite, des cultures primaires de cytotrophoblastes villosus, plus représentatives du placenta, ont pu être obtenues grâce à l'équipe du Dr Thierry Fournier de l'UMR-S 1129.

## I. Cellules JEG-3

La lignée JEG-3 a été mise en culture et incubée en présence de MEHP afin d'obtenir des culots cellulaires utilisés pour différentes analyses : lipidomique globale, eicosanoïdes, oxystérols, transcriptomique.

### 1. Étude préliminaire

Une étude préliminaire effectuée par le Dr Anaïs Wakx durant sa thèse a permis de déterminer la dose et la durée d'incubation des cellules JEG-3 avec le MEHP<sup>331</sup>. En effet, d'après les résultats de cytotoxicité, le MEHP induit une perte de viabilité significative des cellules JEG-3 à partir de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  après 72 h d'incubation à 37 °C (Figure 49). D'après la norme ISO 10993-5, un produit est considéré cytotoxique lorsqu'il induit une perte de viabilité d'au moins 30 %. À 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , le MEHP induit une perte de viabilité de 20 % et n'est donc pas considéré strictement cytotoxique pour les cellules JEG-3 à cette concentration. Dans le cadre des différentes analyses effectuées sur ces cellules durant ma thèse, celles-ci ont donc été incubées à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MEHP durant 72 h.

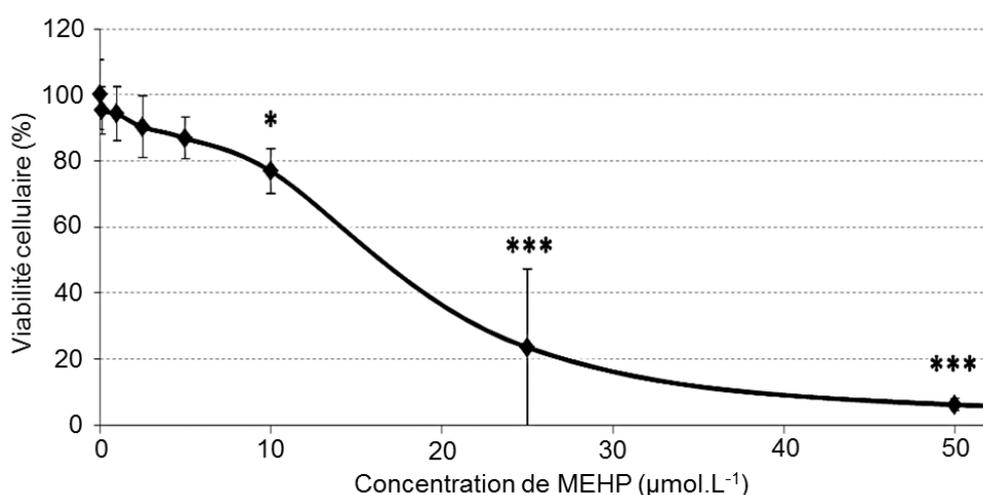


Figure 49 : Viabilité cellulaire de la lignée cellulaire JEG-3 après incubation avec le MEHP (d'après<sup>331</sup>)  
Les cellules JEG-3 ont été incubées durant 72 h avec une gamme de concentration de MEHP. La viabilité cellulaire a été évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique  
\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs 0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MEHP

## 2. Mise en culture et incubation des cellules

Les cellules JEG-3 (ATCC n° HTB-36) ont été cultivées dans du milieu EMEM (*Minimum Essential Medium Eagle*, Eurobio, Les Ulis, France) stérile supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal (SVF), de 1 % de L-glutamine (Glu) et de 0,5 % d'un mélange pénicilline/streptomycine (PS) (Eurobio, Les Ulis, France). Les cellules à confluences ont été décollées par incubation en présence de trypsine puisensemencées à 90 000 cellules.mL<sup>-1</sup> dans des flasques T75 (Corning, Schiphol-Rijk, The Netherlands) pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de MEHP (dilué dans du DMSO) à 10 µmol.L<sup>-1</sup> dans du EMEM à 2,5 % de SVF, durant 72 h. Les cellules contrôles ont été incubées avec du DMSO (0,0025 %). À l'issue des 72 h, les surnageants de cultures ont été récupérés en vue d'effectuer le dosage du MEHP et les culots cellulaires (environ 5 millions de cellules) ont été conservés à sec à -80 °C.

## II. Culture primaire de trophoblastes

Les cytotrophoblastes villositaires (CTV) ont été extraits à partir de placentas à terme obtenus à l'issue d'une césarienne programmée. Dans l'heure suivant leur recueil, les placentas ont été acheminés à l'état frais vers l'unité de recherche UMR-S 1139. Le recueil et l'utilisation des placentas ont été validés par le comité d'éthique de protection des personnes (CPP 2015-mai\_13909).

Dans un premier temps, le tissu placentaire a été disséqué manuellement afin de recueillir les villosités chorionales. Celles-ci ont ensuite été digérées chimiquement par la trypsine (Gibco® by Life Technology™; Carlsbad, Californie, USA) pour libérer les CTV. Après récupération, les CTV ont été isolés sur un gradient de Percoll avant d'êtreensemencés et cultivés. Ces étapes ont été réalisées par le Dr Séverine Degrelle de l'unité de recherche UMR-S 1139.

L'incubation des cellules a été effectuée le lendemain de l'isolement des CTV. Les cellules ont été incubées, ou non (groupe contrôle), pendant 48 h avec 0,1 µmol.L<sup>-1</sup> et 10 µmol.L<sup>-1</sup> de MEHP dilué dans du DMEM complet (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich®.Inc ; St-Louis, Missouri, USA), *i.e* supplémenté de 1 % PS, 1 % Glu et 10 % SVF. Après la période d'incubation, les cellules ont été décollées, centrifugées, congelées dans l'azote liquide puis stockées à -80 °C avant utilisation.

Au total 12 cultures de CTV, provenant de 12 placentas différents, ont été réalisées. Les cellules issues de chacun des 12 placentas ont été pour une partie cultivées en présence du MEHP et pour l'autre partie en l'absence de celui-ci (contrôle) afin de constituer 12 paires d'échantillons de cultures cellulaires. De plus, un réplica biologique a pu être réalisé pour

11 des cultures. Ainsi, 23 culots cellulaires incubés en présence de MEHP à  $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , 23 culots cellulaires incubés en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et 23 culots cellulaires contrôles (DMSO) ont pu être utilisés pour effectuer une analyse lipidomique globale. Le nombre de cellules par culot cellulaire a été estimé à environ 3 millions.

### III. Protocole de l'étude

La lignée cellulaire JEG-3 a été cultivée et incubée en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , dose non cytotoxique, en vue d'effectuer une analyse lipidomique globale ( $n = 20$  vs  $20$ ), une analyse des eicosanoïdes ( $n = 15$  vs  $15$ ) et un dosage des oxystérols ( $n = 5$  vs  $5$ ). Pour chacune de ces analyses, le contrôle de l'incubation des cellules a été mené par dosage du MEHP dans les milieux de culture avant incubation ( $t_{0h}$ ), après incubation ( $t_{72h}$ ) et dans les culots cellulaires. De plus, une étude transcriptomique de certains gènes impliqués dans le métabolisme lipidique placentaire par réaction de polymérisation en chaîne quantitative d'un ADN complémentaire obtenu par transcription inverse d'une ARN messenger (RT-qPCR) a été réalisée (Figure 50).

Par la suite, des cultures primaires de trophoblastes ont été incubées en présence de MEHP à deux concentrations différentes par le Dr Séverine Degrelle. Les culots cellulaires issus de cette étude ont permis d'effectuer une analyse lipidomique globale ( $n = 23/23/23$ ) comparable à celle réalisée sur la lignée cellulaire JEG-3 (Figure 50).

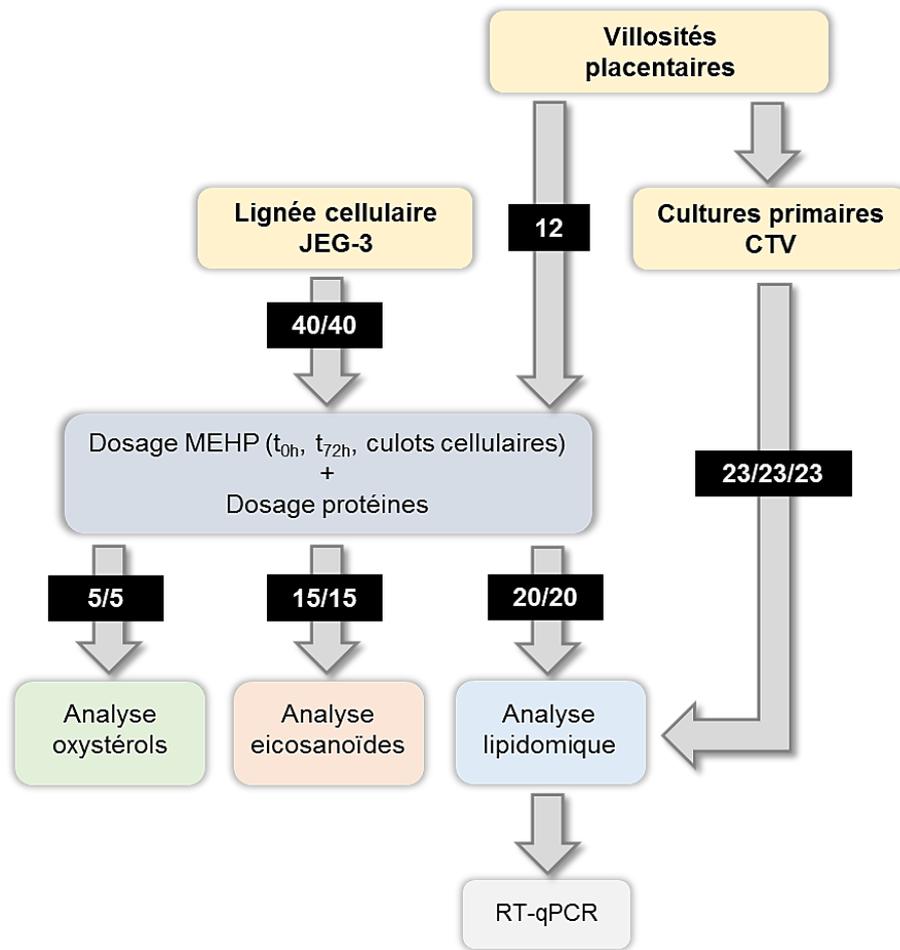


Figure 50 : Protocole de l'étude menée sur la lignée cellulaire JEG-3 et sur la culture primaire de cytotrophoblastes villositaires. Les chiffres sur fond noir représentent le nombre de séries de cultures cellulaires réalisées (incubées MEHP/contrôles)



## Dosage du MEHP

## I. Introduction

L'incubation des cellules JEG-3 a été contrôlée par le dosage du MEHP dans le milieu de culture à  $t_{0h}$  (avant incubation), à  $t_{72h}$  (après incubation) et dans les culots cellulaires (à l'issue de l'incubation). Pour ce faire, une méthode de dosage du MEHP a été, au préalable, développée et validée.

Par la suite, la quantité basale de MEHP a été estimée dans des villosités placentaires issues de placenta à terme.

## II. Matériel et méthodes

### A. Mise au point de la méthode de dosage du MEHP

La méthode de dosage du MEHP comprend une étape d'extraction sur phase solide en mode mixte suivie d'une analyse par UPLC-MS en mode d'ionisation négatif sur un appareil de type Q-TOF (Synapt® G2 High Definition MS™, Waters, Manchester, UK). Dans un premier temps certains paramètres en UPLC-MS ont été ajustés. Par la suite, différentes cartouches et différentes conditions de SPE ont été testées afin d'obtenir un rendement maximal. Une fois la SPE mise au point, l'effet matrice et la répétabilité/reproductibilité ont été évalués et le domaine de linéarité ainsi que la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été déterminés.

#### 1. Ajustement des paramètres d'UPLC-MS

Le MEHP est ionisé en mode négatif et, afin d'améliorer sa détection, certains paramètres du spectromètre de masse ont été ajustés par infusion directe d'une solution à  $100 \text{ nmol.L}^{-1}$ . L'intensité du signal du MEHP a été relevée pour différentes valeurs de tension de capillaire, de cône d'échantillonnage et de cône d'extraction. Les valeurs de ces paramètres retenues sont celles conduisant à l'intensité maximale relevée.

Le MEHP a ensuite été injecté dans le système chromatographique à ultra haute performance (Waters Acquity UPLC System, Manchester, UK). Les données bibliographiques ont permis de mettre au point la méthode chromatographique<sup>332-334</sup>. Le MEHP a été séparé en RPLC sur une colonne BEH™ C<sub>18</sub> (2,1 mm x 50 mm ; 1,7 μm) équipée d'une précolonne BEH™ C<sub>18</sub> maintenue à 45 °C. La phase mobile est constituée d'un solvant A, acide formique (AF) à 2 % dans l'eau et d'un solvant B, acétonitrile, utilisés en mélange suivant le gradient décrit (Figure 51). La durée d'une analyse, incluant le temps de rééquilibrage de la colonne est de 5 min.

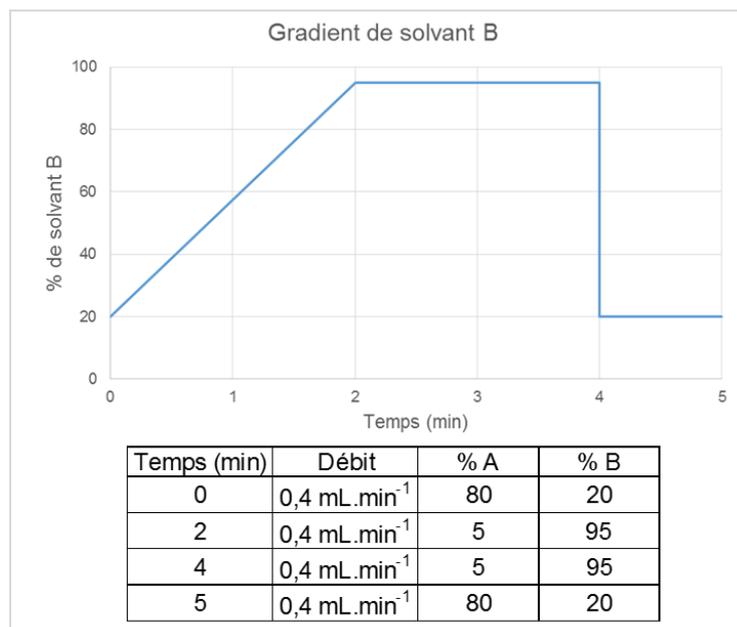


Figure 51 : Gradient chromatographique pour l'analyse du MEHP par UPLC-MS  
Solvant A : AF à 2 % (v/v) dans l'eau ; solvant B : ACN

Dans ces conditions, le temps de rétention du MEHP est de 1,91 min, et celui de son étalon interne MEHP-C<sub>13</sub> (MEHP\*) de 1,92 min (Figure 52). La stabilité du temps de rétention a été évaluée par injection répétée dans les conditions chromatographiques retenues.

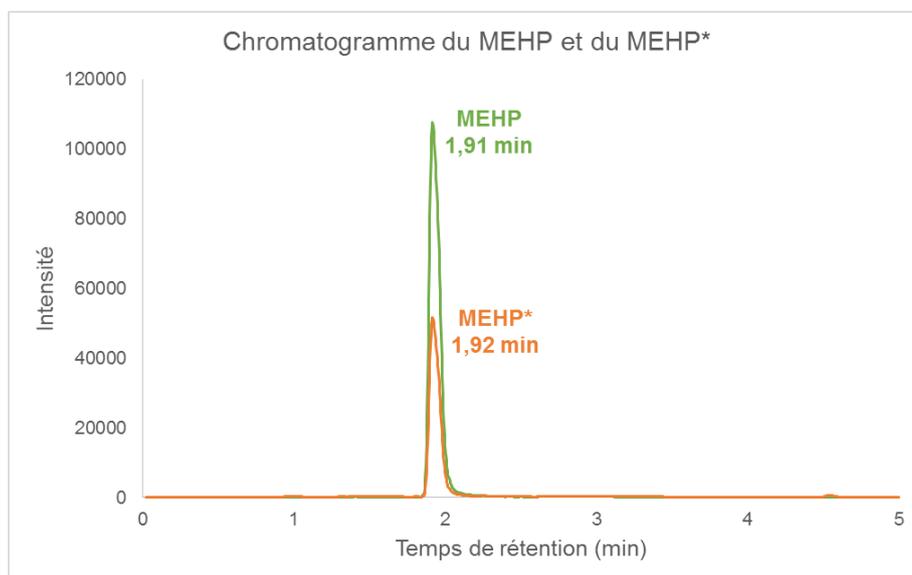


Figure 52 : Temps de rétention du MEHP et du MEHP\* selon le gradient défini

## 2. Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide du MEHP a été testée avec trois types de cartouches (Waters, Manchester, UK) : Oasis® HLB (*Hydrophilic-Lipophilic-Balanced*), Oasis® WAX

(*Weak Anion-eXchange*) et Oasis® MAX (*Mixed-Mode Anion-eXchange*). Il s'agit de cartouches 1 cc, 30 mg, 30  $\mu\text{m}$ . La cartouche Oasis® HLB est un support constitué d'un ratio spécifique de deux types de monomères : l'un hydrophile, N-vinylpyrrolidone et l'autre lipophile, divinylbenzène (Figure 53). Ce support offre une forte capacité de rétention des composés hydrophobes et une amélioration de la rétention des composés polaires. Les supports Oasis® WAX et MAX dérivent du support Oasis® HLB par ajout de groupes fonctionnels ionisés permettant la formation d'interactions ioniques entre l'analyte et la phase stationnaire. Les supports Oasis® WAX et MAX sont caractérisés par la présence respective de groupements pipérazine et ammonium quaternaire, favorisant l'échange d'anion (Figure 53). La combinaison de la rétention hydrophobe et de l'échange d'ion augmente la sélectivité de ce type de support.

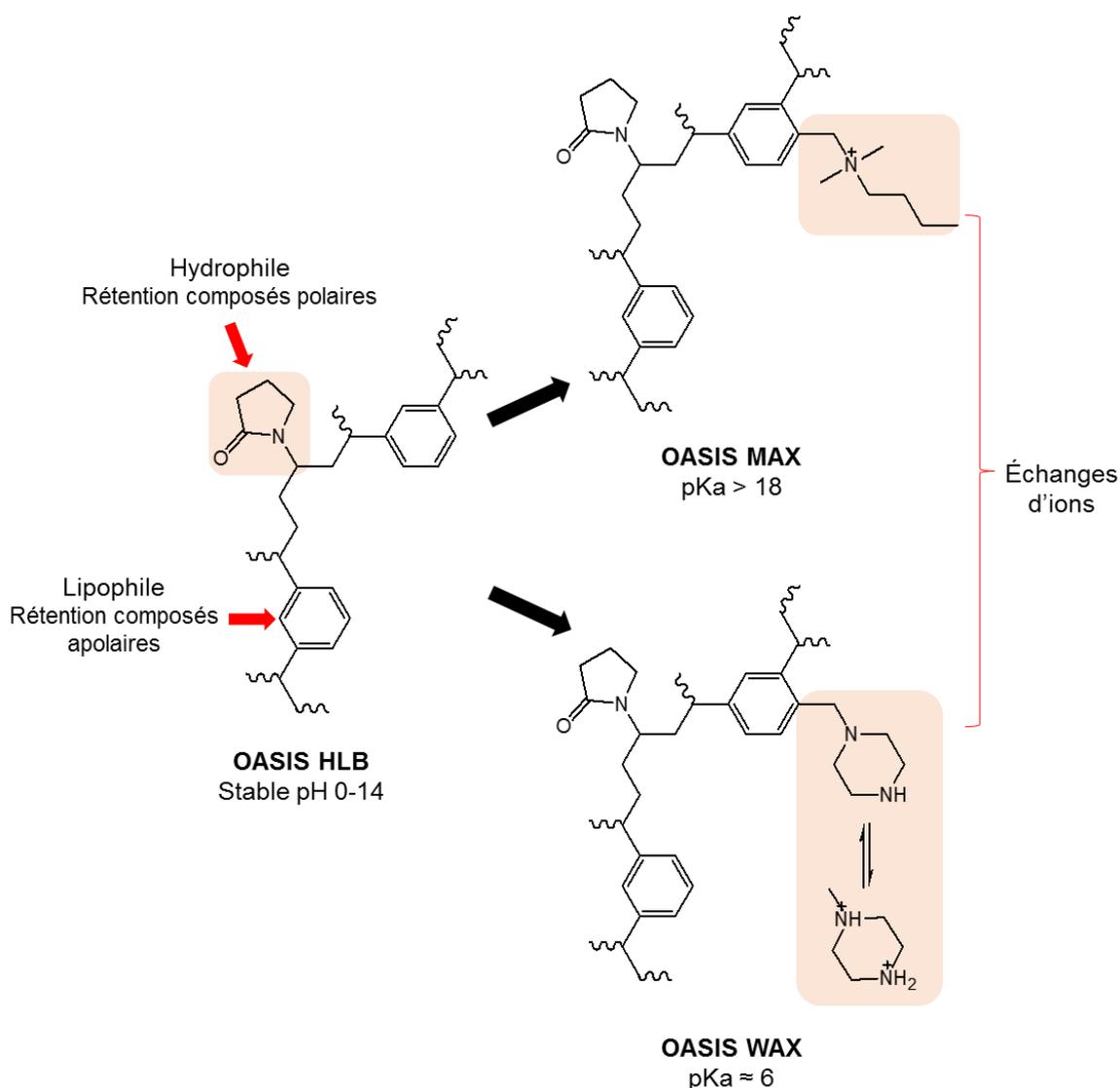


Figure 53 : Structures des différents supports de rétention testés pour l'extraction du MEHP par SPE

Les protocoles d'extraction ont été adaptés de ceux conseillés par le fournisseur (Figure 54).

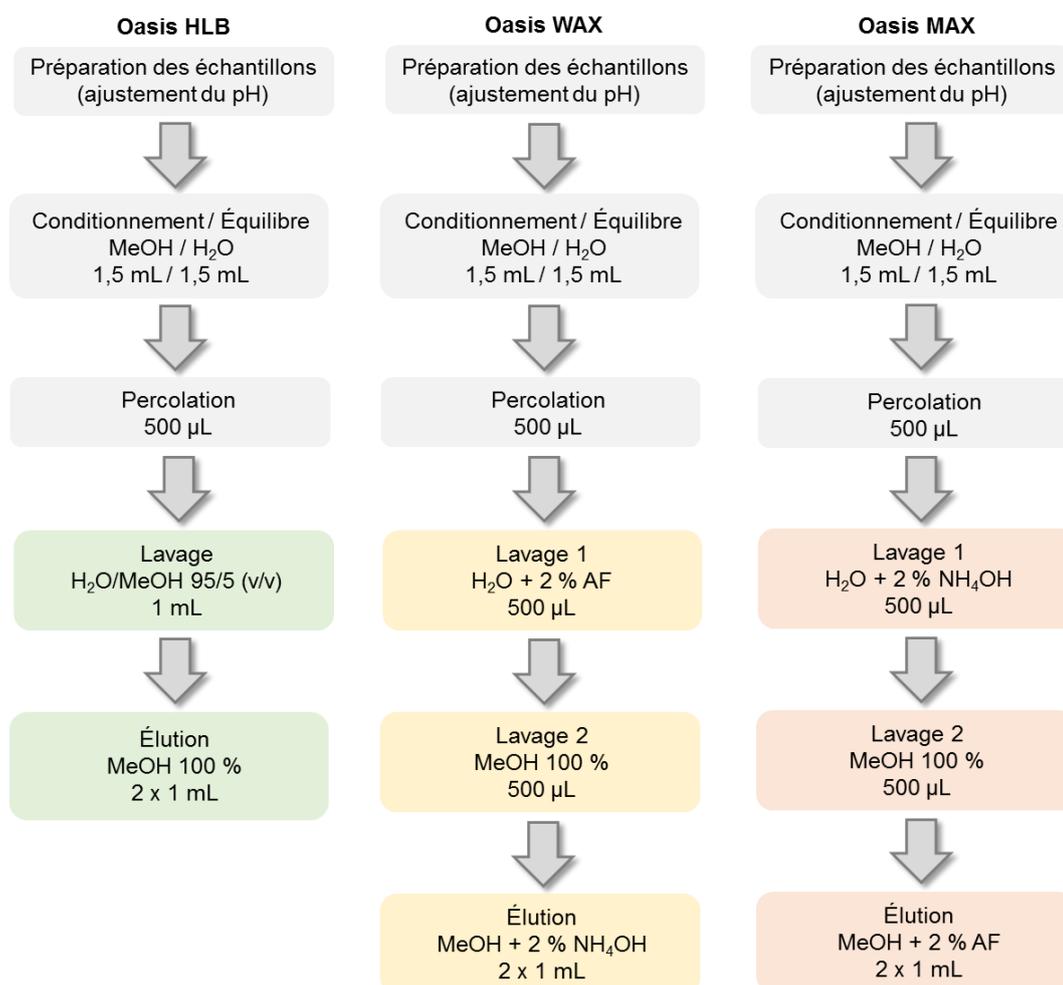


Figure 54 : Protocoles de SPE testés selon le type de supports Oasis® HLB, WAX ou MAX  
AF : acide formique, NH<sub>4</sub>OH : hydroxyde d'ammonium

L'extraction du MEHP par ces trois types de phases a été évaluée pour deux concentrations (1 µmol.L<sup>-1</sup> et 10 nmol.L<sup>-1</sup>), avec et sans ajout d'AF à la solution de percolation. Les éluats ont ensuite été évaporés à sec sous pression réduite à 45°C (SpeedVac®, Thermo Fisher Scientific, France), puis repris dans un mélange H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 v/v pour être analysés en UPLC-MS.

Les rendements d'extraction ont été calculés par rapport à un témoin non extrait évaporé et repris dans les mêmes conditions que les échantillons et par rapport à un standard non extrait et non évaporé. Un rendement de 100 ± 15% est considéré acceptable.

Une fois le support choisi, différents mélanges de solvants ont été testés lors de l'étape de lavage : MeOH, MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5 v/v et MeOH + 2 % AF. La répétabilité de la SPE sur ce support a également été évaluée.

### 3. Effet matrice

Trois gammes de concentration en MEHP de 10 à 100 nmol.L<sup>-1</sup> ont été réalisées dans l'eau, le milieu de culture pur et le milieu de culture dilué au dixième dans l'eau. Une quantité fixe d'étalon interne a été ajoutée dans chacun des points de gamme. Le ratio entre l'aire du MEHP et celle de son étalon interne (ratio MEHP/MEHP\*) a été calculé pour chaque point et a permis d'évaluer l'effet matrice.

L'évaluation de l'effet matrice dans les culots cellulaires, broyés et repris dans l'eau, a été effectuée pour trois concentrations de MEHP, par rapport aux trois mêmes concentrations dans l'eau. Une quantité fixe d'étalon interne a également été ajoutée pour chaque point et le ratio MEHP/MEHP\* a été calculé.

### 4. Validation de la méthode

La répétabilité, la reproductibilité, la linéarité, la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été déterminées par la suite. La répétabilité et la reproductibilité ont été déterminées par le calcul du coefficient de variation (CV) des ratios MEHP/MEHP\* calculés à partir des aires des pics chromatographiques. Un CV inférieur à 15 % est considéré correct et permet de valider ces deux critères. La LOD et la LOQ ont été estimées pour un rapport S/N supérieur à 3 et à 10, respectivement. Trois points de contrôles qualités ont été ajoutés afin de déterminer l'exactitude de la méthode.

## B. Dosage du MEHP dans diverses matrices biologiques

### 1. Dosage dans les milieux de culture et les culots cellulaires

Afin de contrôler l'incubation des cellules utilisées pour les différentes analyses (lipides, eicosanoïdes, oxystérols), le MEHP a été dosé dans le milieu de culture avant incubation ( $t_{0h}$ ). De plus, dans le but de quantifier le MEHP au niveau des cellules, un dosage a également été effectué dans le milieu de culture après incubation ( $t_{72h}$ ) et dans les culots cellulaires. Un dosage de protéines, par la méthode BCA (*Bicinchoninic acid assay*), a également été réalisé afin de normaliser les résultats à la quantité de protéines. Le protocole appliqué est celui déterminé lors de la validation de la méthode de dosage :

- les milieux de culture ont été dilués au dixième dans 500  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O ; les culots cellulaires ont été broyés et repris dans 500  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O ;
- l'étalon interne du MEHP a été ajouté pour être à 100 nmol.L<sup>-1</sup> dans les solutions de percolation ainsi que l'AF à 2 % (v/v) dans l'eau ;

- les cartouches Oasis® WAX ont été conditionnées avec 1,5 mL de MeOH puis 1,5 mL d'H<sub>2</sub>O ;
- les échantillons ont été percolés ;
- les cartouches ont été lavées avec de l'AF à 2 % (v/v) dans l'eau puis par un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5 (v/v) ;
- le MEHP a été élué par 1,5 mL de MeOH contenant 2 % en volume de NH<sub>4</sub>OH ;
- les éluats ont été évaporés sous vide à 45 °C puis repris dans un mélange H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 en volume avant d'être injectés dans le système UPLC-MS.

## 2. Dosage dans les villosités placentaires

Des villosités placentaires (n = 12) issues de césariennes programmées sur des placentas à termes ont été isolées par le Dr Séverine Degrelle de l'UMR-S 1139 et stockées à -80 °C. Afin d'extraire le MEHP des villosités, celles-ci ont été broyées dans l'azote liquide puis reprises dans l'eau et centrifugées. Le surnageant, préalablement acidifié (AF aqueux 2 % (v/v)), a ensuite été percolé sur des cartouches Oasis® WAX et l'extraction du MEHP a été réalisée selon le protocole détaillé précédemment. Une gamme de 1 à 500 nmol.L<sup>-1</sup> a été réalisée et extraite en parallèle. Les résultats ont été normalisés à la masse de tissu.

## III. Résultats

### A. Mise au point de la méthode de dosage

#### 1. Ajustement des paramètres d'UPLC-MS

Différentes valeurs de tension de capillaire, de cône d'échantillonnage et de cône d'extraction ont été testées et les résultats sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau 15).

Tableau 15 : Intensité du pic MEHP en fonction des valeurs des paramètres testés

Tension capillaire (kV)	Tension cône d'échantillonnage (V)	Tension cône d'extraction (V)	Intensité pic MEHP
2,00	38	4	4,76. 10 <sup>3</sup>
2,24	38	4	5,88. 10 <sup>4</sup>
2,50	38	4	1,98. 10 <sup>4</sup>

Tension capillaire (kV)	Tension cône d'échantillonnage (V)	Tension cône d'extraction (V)	Intensité pic MEHP
2,24	20	4	6,50. 10 <sup>3</sup>
2,24	25	4	3,42. 10 <sup>3</sup>
2,24	30	4	5,88. 10 <sup>4</sup>
2,24	35	4	3,08. 10 <sup>4</sup>
2,24	38	4	2,09. 10 <sup>4</sup>
2,24	50	4	2,30. 10 <sup>3</sup>

Tension capillaire (kV)	Tension cône d'échantillonnage (V)	Tension cône d'extraction (V)	Intensité pic MEHP
2,24	38	2	2,98. 10 <sup>4</sup>
2,24	38	3	4,42. 10 <sup>4</sup>
2,24	38	4	5,88. 10 <sup>4</sup>
2,24	38	5	5,55. 10 <sup>4</sup>

Les valeurs sur fond gris correspondent aux valeurs des paramètres par défauts  
 Les valeurs sur fond vert correspondent aux valeurs choisies pour l'intensité maximale du MEHP

Les résultats obtenus montrent que les paramètres dont l'ajustement a le plus d'effet sur l'ionisation du MEHP sont les tensions du capillaire et du cône d'échantillonnage puisque l'intensité du MEHP peut être augmentée d'un facteur 10. Néanmoins le gain d'intensité obtenu après ajustement de ces trois paramètres reste relativement faible. L'intensité maximale du MEHP est enregistrée pour une tension de capillaire de 2,24 kV, une tension du cône d'échantillonnage de 38 V et une tension du cône d'extraction de 4 V.

La stabilité du temps de rétention a été évaluée sur 10 injections répétées d'une solution de MEHP à 100 nmol.L<sup>-1</sup>, dans les conditions chromatographiques retenues précédemment. Le coefficient de variation est de 1 %, traduisant une très bonne stabilité du temps de rétention du MEHP.

L'ensemble des paramètres retenus pour la méthode UPLC-MS utilisée pour l'analyse du MEHP est regroupé dans le tableau récapitulatif suivant (Tableau 16) :

Tableau 16 : Paramètres choisis pour l'analyse du MEHP par UPLC-MS

Paramètres LC	
Colonne	BEH C <sub>18</sub> (2,1 mm x 50 mm; 1,7 µm)
Phase mobile A	H <sub>2</sub> O + 2 % AF
Phase mobile B	ACN
Débit	0,4 mL.min <sup>-1</sup>
Température de la colonne	45 °C
Température de l'échantillonneur	4 °C
Temps d'analyse	5 min
Temps de rétention du MEHP	1,91 min
Temps de rétention du MEHP*	1,92 min
Paramètres MS	
Mode de détection	négatif, résolution
Tension capillaire	2,24 kV
Tension cône d'échantillonnage	30 V
Tension cône d'extraction	4 V
Température de la source	120 °C
Température de désolvatation	600 °C
Temps de balayage	0,1 s

## 2. Extraction sur phase solide

Trois types de supports d'extraction ont été testés, à l'aide de deux solutions aqueuses de MEHP de concentrations différentes, avec ou sans ajout d'AF à 2 % en volume. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 55, Figure 56, Figure 57).

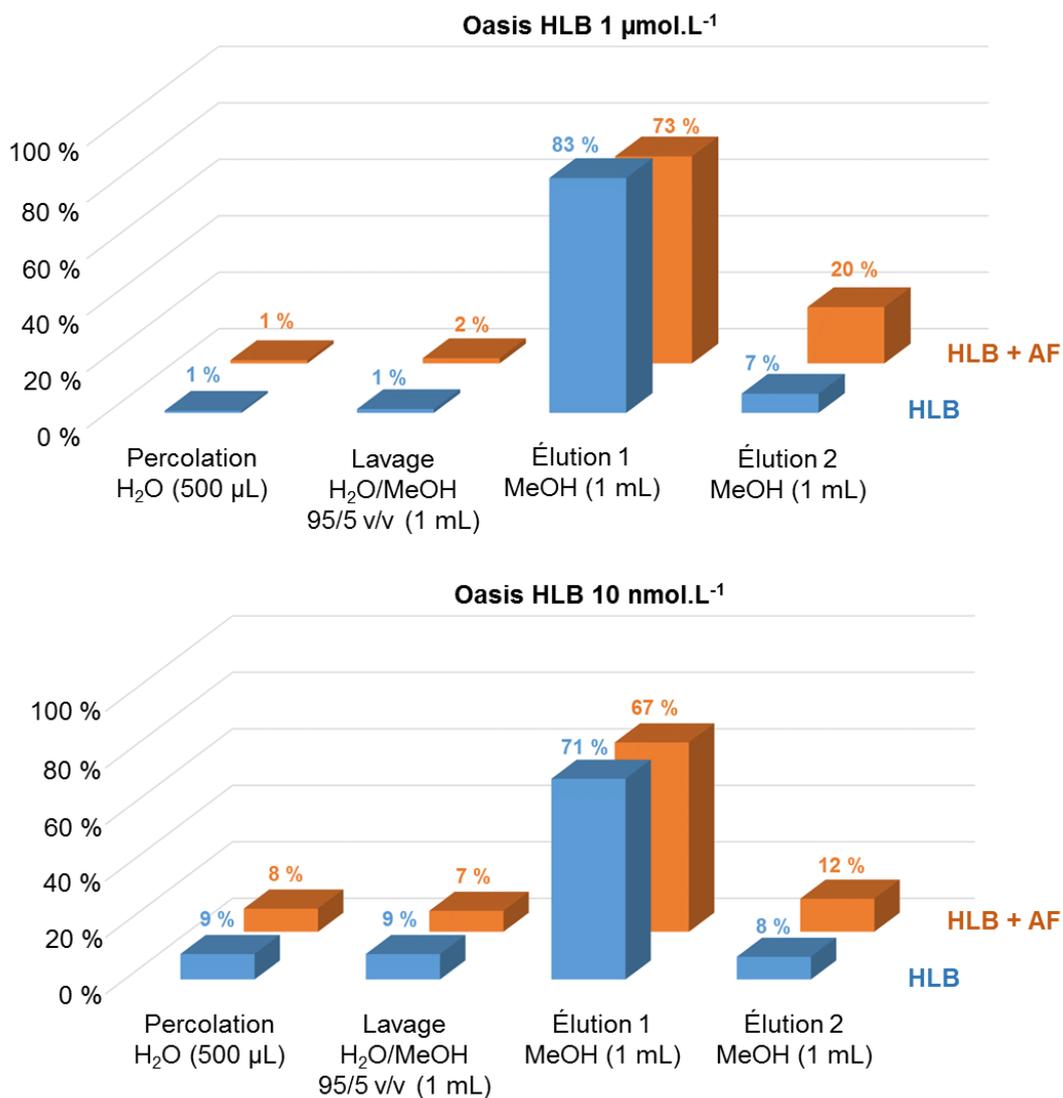


Figure 55 : Rendements d'extraction du MEHP à deux concentrations différentes dans l'eau, sur cartouches Oasis® HLB, avec et sans ajout d'acide formique à la solution de percolation (n = 1)



Figure 56 : Rendements d'extraction du MEHP à deux concentrations différentes dans l'eau, sur cartouches Oasis® WAX, avec et sans ajout d'acide formique à la solution de percolation (n = 1)

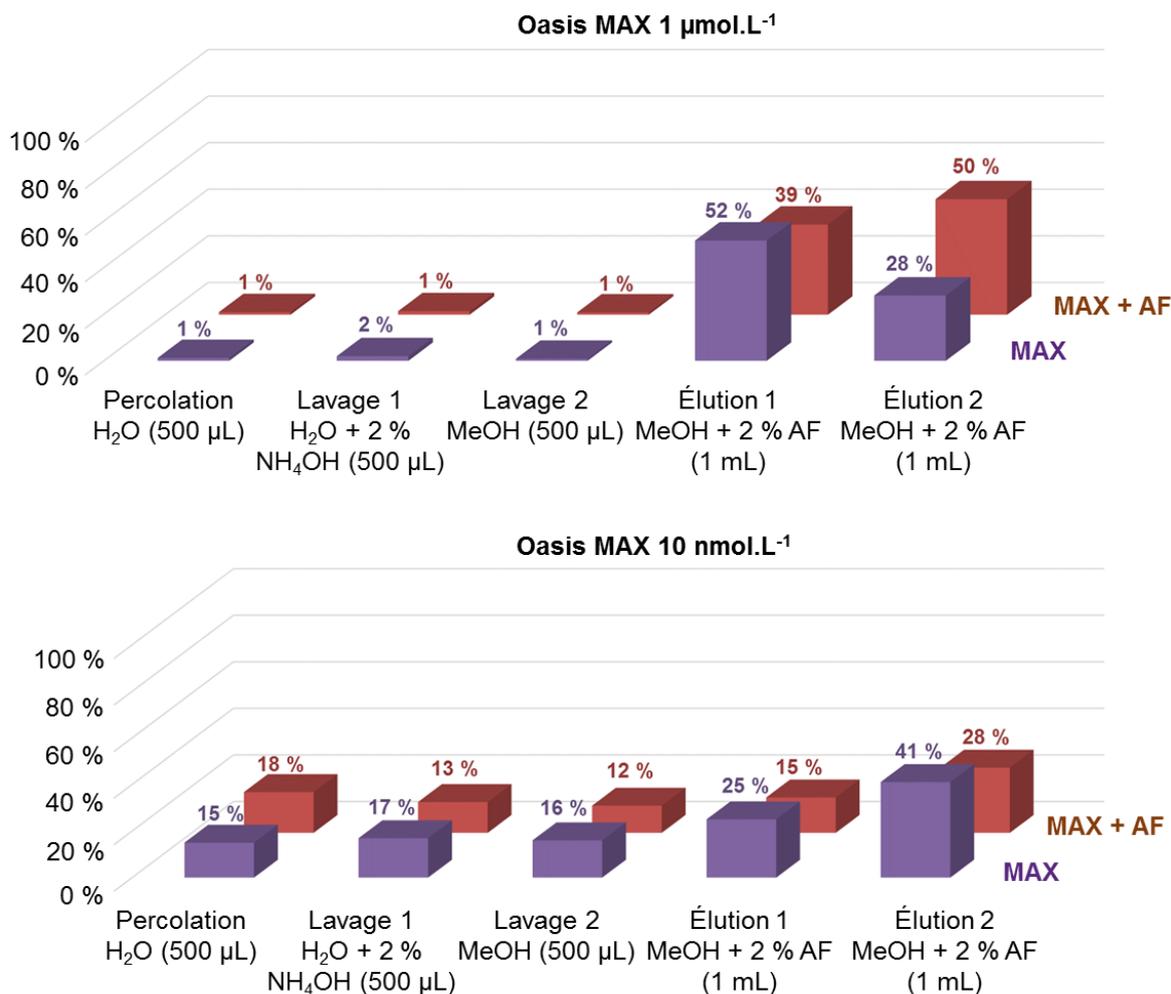


Figure 57 : Rendements d'extraction du MEHP à deux concentrations différentes dans l'eau, sur cartouches Oasis® MAX, avec et sans ajout d'acide formique à la solution de percolation (n = 1)

L'extraction sur support Oasis® HLB conduit à une très bonne rétention du MEHP à 1 µmol.L<sup>-1</sup> sans ajout d'AF lors de la percolation (Figure 55). Aucune perte n'est observée lors de l'étape de lavage et un rendement d'extraction de 90 % est obtenu. L'ajout d'AF à 2 % (v/v) à la solution de percolation conduit à un résultat très similaire puisque le rendement d'extraction s'établit à 93 %. Lorsque la concentration de la solution de MEHP est diminuée à 10 nmol.L<sup>-1</sup>, une perte de 15-20 % a lieu lors des étapes de percolation et de lavage, que l'on procède avec ou sans ajout d'AF. Cependant, le rendement global d'extraction reste correct à environ 80 %.

L'extraction de la solution à 1 µmol.L<sup>-1</sup> sur support Oasis® WAX mène à une très bonne rétention du MEHP lors de la percolation et des deux étapes de lavage (Figure 56). Des rendements de 100 % sont obtenus avec et sans ajout d'acide. Les mêmes observations sont

faites pour la solution à  $10 \text{ nmol.L}^{-1}$  avec une perte légère lors des lavages, de l'ordre de 10-15 % et des rendements d'extraction de 90-95 %.

L'extraction sur les cartouches Oasis® MAX montre également une très bonne rétention du MEHP à  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  lors des étapes de percolation et de lavages (Figure 57). En revanche, l'étape d'élution ne permet pas d'obtenir un rendement d'extraction maximal puisque celui-ci est de 89 % et 80 % avec et sans AF, respectivement. De plus, l'extraction de la solution à  $10 \text{ nmol.L}^{-1}$  conduit à une perte importante lors des étapes de percolation et de lavages. En effet, une perte d'environ 45 % est observée lors de ces étapes. Le rendement global d'extraction est alors de 66 % et de 43 % sans AF et avec AF.

Le MEHP est donc très bien retenu sur les trois types de supports à l'exception du support MAX lorsqu'une solution à  $10 \text{ nmol.L}^{-1}$  est utilisée. L'extraction sur Oasis® HLB est la plus facile de mise en œuvre puisqu'une seule étape de lavage est nécessaire, et conduit à de bons rendements d'extraction. Bien qu'il oblige à une étape de lavage supplémentaire, le support WAX offre une sélectivité accrue et un rendement d'extraction proche de 100 % dans le cas d'une solution de percolation à 2 % d'AF et à  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . De plus, ce support montre également les meilleurs rendements d'extraction pour la solution de MEHP à  $10 \text{ nmol.L}^{-1}$ . Enfin, le support MAX n'aboutit pas à des rendements optimaux lors de l'élution ; l'élution complète du MEHP nécessite un volume de solvant organique plus important. Au vu de ces résultats, les cartouches HLB et WAX semblent être les plus adaptées à l'extraction du MEHP et, en raison de la rétention mixte proposée par le support WAX, ce dernier a alors été privilégié. De plus, l'ajout d'AF à 2 % (v/v) dans l'eau lors de la percolation semble améliorer le rendement global d'extraction sur ce support.

L'extraction du MEHP a donc été effectuée à l'aide des cartouches Oasis® WAX avec une solution de percolation contenant de l'AF à 2 % (v/v) dans l'eau et un mélange d'élution réalisé avec 1,5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 2 % (v/v) dans le MeOH. Différents solvants ont été testés pour la seconde étape de lavage : MeOH, MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  95/5 (v/v) et AF à 2 % (v/v) dans le MeOH. Les résultats ( $n = 3$ ) sont représentés ci-dessous (Figure 58).

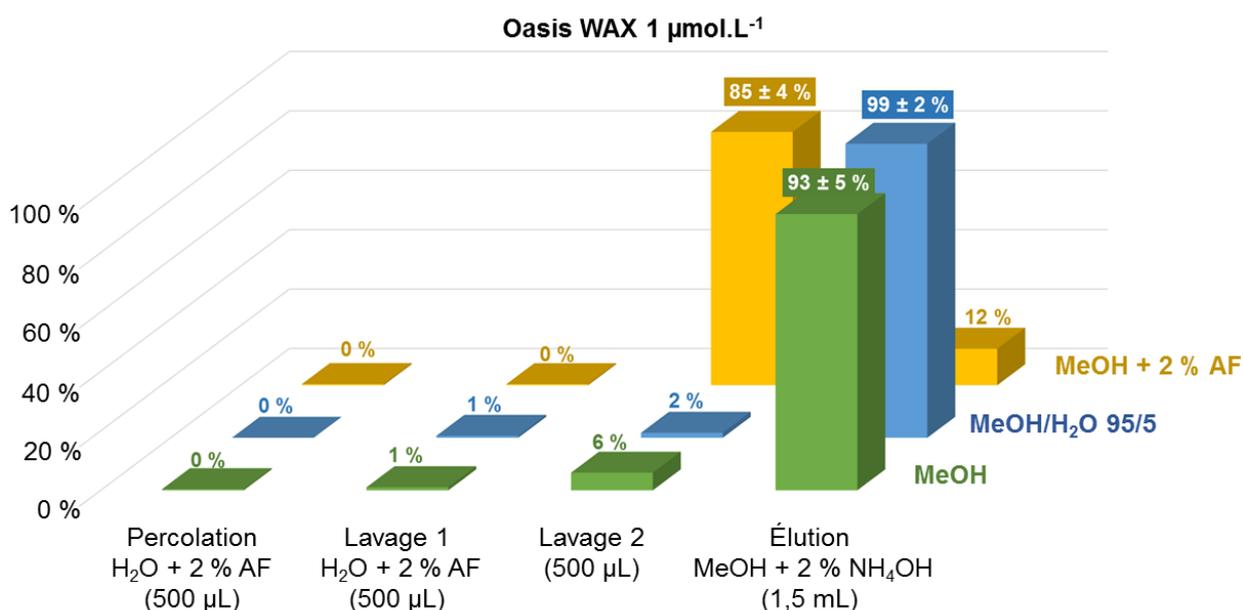


Figure 58 : Rendements d'extraction du MEHP ( $n = 3$ ) selon les solvants utilisés pour la seconde étape de lavage, sur cartouches Oasis® WAX, à  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , en présence d'AF à 2 % lors de la percolation

D'après les résultats, un second lavage MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5 (v/v) permet une meilleure rétention du MEHP. En revanche, l'ajout d'AF entraîne une perte totale de rétention de l'analyte d'intérêt. L'ajustement du pH est donc primordial durant les différentes étapes de SPE. La répétabilité a été évaluée sur trois extractions et conduit à un CV moyen sur le rendement d'extraction inférieur à 10 %. L'extraction du MEHP par SPE sur support Oasis® WAX a donc été retenue ; le MEHP-C<sub>13</sub> à une concentration finale de  $100 \text{ nmol.L}^{-1}$  a été ajouté à la solution de percolation contenant l'AF à 2 % (v/v) ; le premier lavage est constitué d'AF à 2 % (v/v) dans l'eau et le second d'un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5 (v/v) ; l'élution complète du MEHP est réalisée par un mélange NH<sub>4</sub>OH à 2 % (v/v) dans le MeOH.

### 3. Effet matrice

Un éventuel effet matrice lorsque le MEHP est extrait à partir du milieu de culture pur et dilué au dixième et à partir des culots cellulaires, a été évalué. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 59, Figure 60).

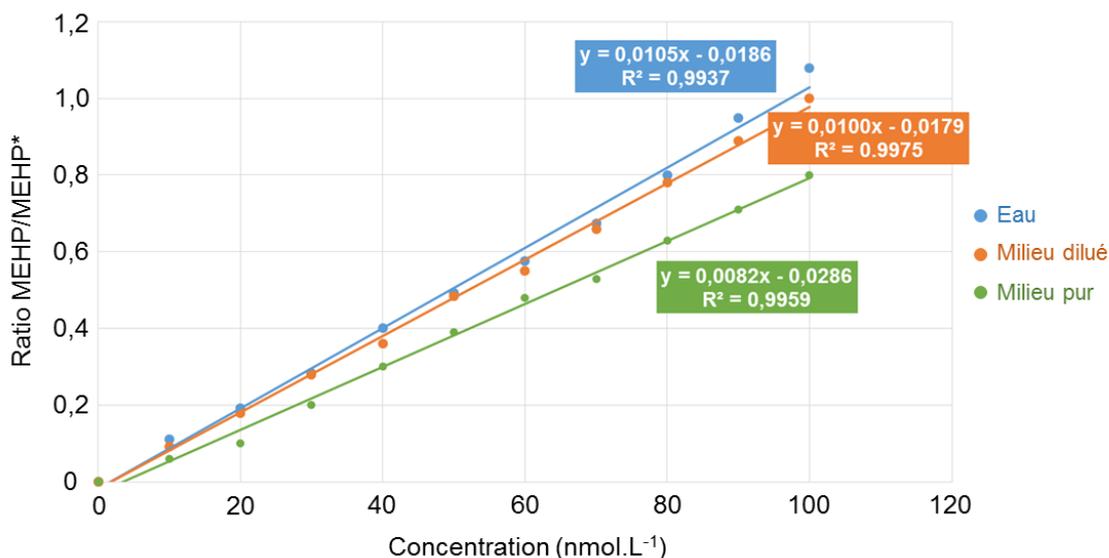


Figure 59 : Effet matrice entre l'eau, le milieu de culture pur et le milieu de culture dilué au dixième, pour l'analyse du MEHP entre 10 et 100 nmol.L<sup>-1</sup> (n = 1)

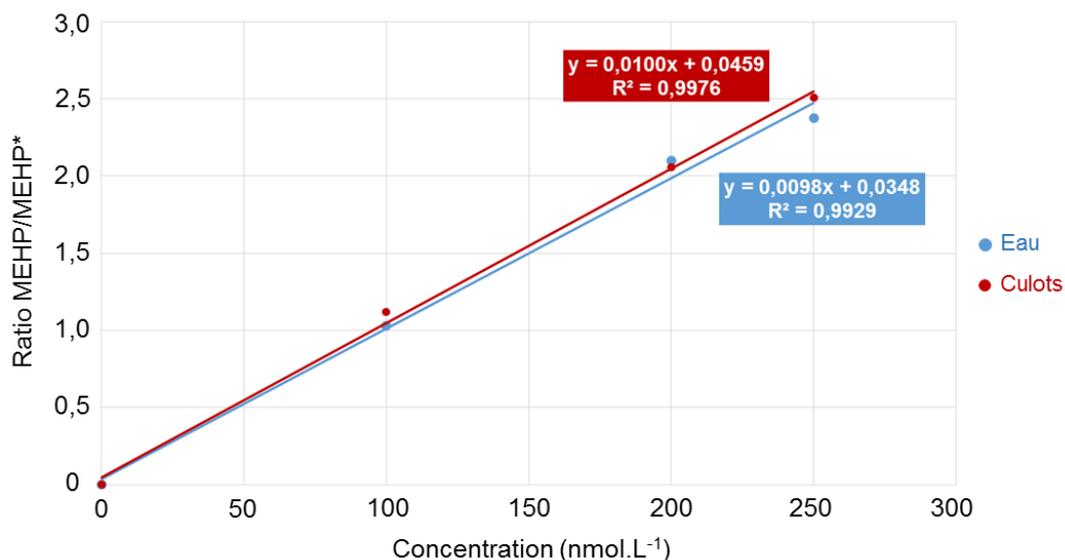


Figure 60 : Effet matrice entre l'eau et les culots cellulaires repris et broyés dans l'eau, à trois concentrations différentes : 100, 200 et 250 nmol.L<sup>-1</sup> (n = 1)

Un effet matrice est observé uniquement lors de l'extraction du MEHP à partir du milieu de culture pur. En revanche, cet effet matrice disparaît lorsque l'extraction est réalisée à partir du milieu de culture dilué au dixième. Il n'est pas non plus observé à partir des culots cellulaires. De fait, la validation de la méthode a été réalisée dans l'eau et, dans le cas du dosage du MEHP dans le milieu de culture, ce dernier a alors été préalablement dilué au dixième.

#### 4. Validation de la méthode de dosage

La LOD est estimée à 1 nmol.L<sup>-1</sup>, soit 10 fmoles injectées (3 pg) et la LOQ à 10 nmol.L<sup>-1</sup>, soit 0,1 pmoles injectées (30 pg). La concentration d'incubation au MEHP des cellules JEG-3 étant de 10 µmol.L<sup>-1</sup>, les gammes de validation ont été réalisées jusqu'à cette valeur. La concentration de MEHP dans les culots cellulaires étant inconnue, le point bas a été déterminé à la LOQ, soit 0,01 µmol.L<sup>-1</sup> (10 nmol.L<sup>-1</sup>). La répétabilité (n = 3) et la reproductibilité (n = 3) ont été évaluées et les résultats de la répétabilité sont présentés ci-dessous (Figure 61).

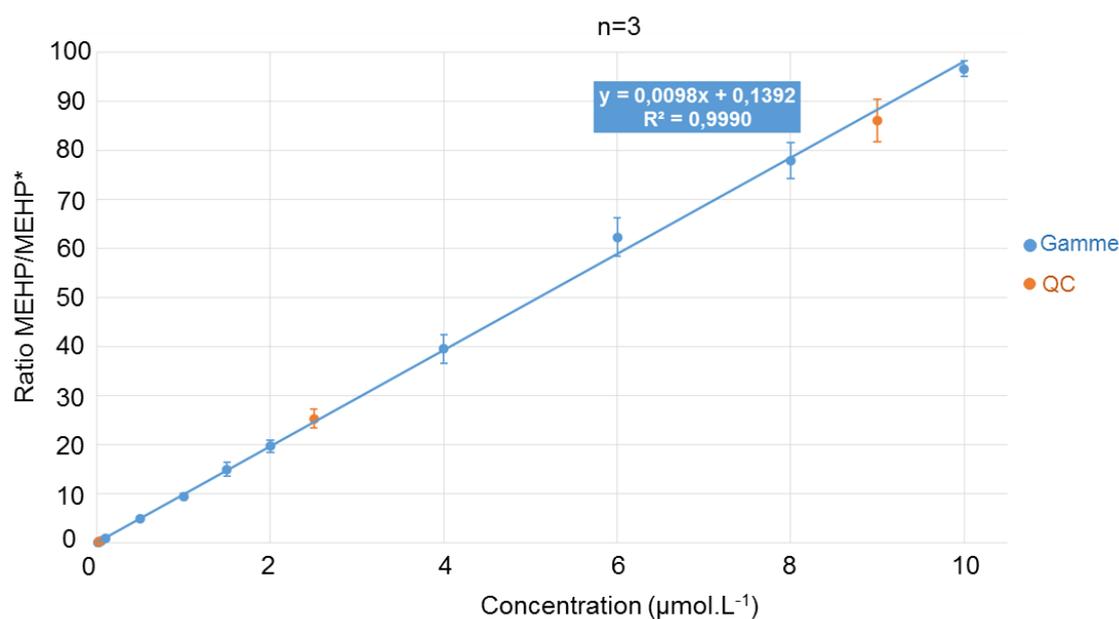


Figure 61 : Répétabilité de la méthode de dosage du MEHP, dans l'eau, pour une gamme allant de 0,01 à 10 µmol.L<sup>-1</sup> (n = 3)  
QC : points de contrôle qualité

Les CV calculés sont inférieurs à 10 % ; la méthode de dosage est donc répétable et reproductible. L'évaluation de la linéarité par la valeur du R<sup>2</sup> montre que la méthode est linéaire sur une gamme de 0,01 à 10 µmol.L<sup>-1</sup>. L'exactitude calculée à partir des points de contrôle qualité est de 97 %. La méthode mise au point est donc validée et peut être appliquée à la quantification du MEHP dans les matrices biologiques étudiées.

#### B. Dosage du MEHP dans diverses matrices biologiques

Le dosage du MEHP a été réalisé sur diverses matrices biologiques : milieux de culture, culots cellulaires et villosités placentaires. Ces études ont permis de contrôler la concentration réelle d'incubation des cellules JEG-3 lors de leur mise en culture en présence de MEHP,

d'estimer la quantité de MEHP retrouvé au niveau des cellules après incubation pendant 72 h et de doser le MEHP à un niveau basal dans le placenta (villosités placentaires).

### 1. Dosage du MEHP dans les milieux de culture et les culots cellulaires

Le MEHP a été dosé dans les solutions d'incubation à  $t_{0h}$  et  $t_{72h}$ , afin de contrôler la concentration réelle à laquelle les cellules ( $n = 40$ ) ont été incubées. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 17).

Tableau 17 : Quantification du MEHP ( $n = 40$ ) dans les milieux de cultures avant ( $t_{0h}$ ) et après ( $t_{72h}$ ) incubation en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$

n=40	
Échantillons	Concentration expérimentale de MEHP ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
Milieux de cultures à $t_{0h}$ surchargés en MEHP	$11,6 \pm 2,1$
Milieux de cultures à $t_{72h}$ surchargés en MEHP	$9,9 \pm 1,8$
Milieux de cultures à $t_{72h}$ non surchargés (DMSO)	$0,375 \pm 0,04$

Dans le milieu de culture surchargé, la concentration moyenne en MEHP mesurée avant contact avec les cellules ( $t_{0h}$ ), est de  $11,6 \pm 2,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Après 72h de contact avec les cellules ( $t_{72h}$ ), elle est de  $9,9 \pm 1,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Dans le milieu de culture non surchargé (DMSO), après 72 h d'incubation en présence des cellules, le taux de MEHP est en moyenne de  $0,375 \pm 0,04 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Le dosage du MEHP a également été effectué à partir des culots cellulaires ( $n = 40$ ) afin d'évaluer la quantité de ce phtalate retrouvé dans les cellules (Tableau 18).

Tableau 18 : Quantification du MEHP ( $n = 40$ ) dans les culots cellulaires incubés à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et dans les culots contrôles

n=40			
Échantillons	Concentration expérimentale de MEHP ( $\text{nmol.L}^{-1}$ )	Quantité de protéines ( $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ )	Quantité de MEHP/quantité de protéines ( $\text{ng.mg}^{-1}$ )
Culots incubés au MEHP	$22,4 \pm 3,2$	$4,1 \pm 0,7$	$4,7 \pm 1,6$
Culots contrôles (DMSO)	$15,3 \pm 3,1$	$3,5 \pm 0,8$	$3,1 \pm 0,8$

La quantité moyenne de MEHP mesurée dans les culots cellulaires incubés est de  $4,7 \pm 1,6 \text{ng.mg}^{-1}$  de protéines et celle mesurée dans les contrôles est de  $3,1 \pm 0,8 \text{ng.mg}^{-1}$  de protéines.

## 2. Dosage dans les villosités placentaires

Le MEHP a été quantifié dans les villosités placentaires issues de 12 placentas différents à terme. Les résultats ont été rapportés à la masse de tissu pesé. La quantité de MEHP retrouvée dans les villosités est de  $9,7 \pm 3,4 \text{ nmol.L}^{-1}$  soit  $62 \pm 29 \text{ pg.g}^{-1}$  de tissu.

## IV. Discussion

La concentration moyenne en MEHP mesurée dans le milieu de culture surchargé, avant contact avec les cellules ( $t_{0h}$ ), est de  $11,6 \pm 2,1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Après 72h de contact avec les cellules ( $t_{72h}$ ), elle est de  $9,9 \pm 1,8 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Le taux moyen de MEHP mesuré à  $t_{0h}$  est significativement différent ( $p\text{-value} < 0,05$ ) de celui déterminé à  $t_{72h}$ . Ce résultat suggère qu'une légère dégradation du MEHP dans le milieu de culture au cours de l'incubation des cellules peut avoir lieu. Néanmoins, bien qu'une différence significative soit observée, la quantité de MEHP dosée à  $t_{72h}$  reste proche de la dose d'incubation, suggérant ainsi que la quantité de MEHP ayant pénétrée à l'intérieur des cellules est très faible. Dans le milieu de culture non surchargé (DMSO), après 72 h d'incubation en présence des cellules, le taux moyen de MEHP est  $0,375 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Cette concentration n'est pas significativement différente de celle obtenue à partir d'un milieu de culture n'ayant pas été au contact des cellules JEG-3. Ces résultats indiquent, d'une part, une légère contamination du milieu de culture et, d'autre part, que celle-ci ne peut pas être imputée à une métabolisation du DEHP par les cellules JEG-3 qui contaminerait le milieu et le matériel. Après analyse des différents composants du milieu de culture, la contamination semble provenir du sérum de veau foetal.

Dans les culots cellulaires incubés en présence de MEHP, la quantité moyenne de ce dernier est de  $4,7 \pm 1,6 \text{ ng.mg}^{-1}$  de protéines ; elle est significativement différente ( $p\text{-value} < 0,05$ ) de celle mesurée dans les culots cellulaires contrôles qui est de  $3,1 \pm 0,8 \text{ ng.mg}^{-1}$  de protéines. L'incubation des cellules avec le MEHP à  $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  provoque donc une augmentation de la quantité cellulaire de ce métabolite d'environ 52 %. Toutefois, la quantité de MEHP ayant pénétré à l'intérieur des cellules est extrêmement faible au regard de la quantité à laquelle elles ont été exposées. Effectivement, elle est en moyenne de 2,6 ng ce qui représente environ 0,7 % de la quantité moyenne de MEHP introduite dans le milieu de culture d'incubation.

Le dosage de protéines effectué sur les culots cellulaires ( $n = 40$ ) ne montre pas de différence significative entre les culots cellulaires incubés avec le MEHP et les culots cellulaires contrôles ( $p\text{-value} > 0,005$ ). De plus, le même nombre de cellules (environ

5 millions) a été compté dans tous les culots cellulaires. Il semble donc que le MEHP n'induit pas d'effet cytotoxique marqué sur les cellules JEG-3 à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h, ce qui corrobore les résultats obtenus par le Dr Anaïs Wakx durant sa thèse.

La quantité moyenne de MEHP retrouvé dans les villosités placentaires est de  $9,7 \pm 3,4 \text{ nmol.L}^{-1}$ , soit  $62 \pm 29 \text{ pg.g}^{-1}$  de tissu. Cette quantité semble proche de celle retrouvée dans les culots cellulaires JEG-3 contrôles ( $15 \text{ nmol.L}^{-1}$ ). D'après la littérature, la quantité de MEHP dosé dans d'autres matrices biologiques est environ 1 000 fois plus élevée que celle calculée dans les villosités placentaires. En effet, les études effectuées sur les cheveux<sup>335</sup>, le liquide amniotique<sup>158</sup>, la salive<sup>336</sup> et le sérum<sup>332,333</sup> reportent des valeurs de l'ordre du  $\text{ng.g}^{-1}$  de tissu. Les villosités provenant de placentas à termes, une métabolisation du MEHP par oxydation et/ou hydroxylation peut avoir eu lieu durant les neuf mois de grossesse et expliquer la faible quantité retrouvée. De fait, le dosage de ce phtalate dans des villosités issues de placentas précoces permettrait d'estimer une éventuelle accumulation ou dégradation de ce dernier dans le placenta, durant la grossesse.

## V. Conclusion

La mise au point d'une méthode de quantification du MEHP a permis de contrôler l'incubation des cellules JEG-3 lors de leur mise en culture. Les résultats ont montré que les cellules ont bien été incubées à la concentration de MEHP désirée, soit environ  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . De plus, le dosage du MEHP dans les culots cellulaires a permis d'observer une accumulation d'environ 52 % de celui-ci au niveau des cellules. Le dosage de protéines a également confirmé le faible effet cytotoxique du MEHP dans les conditions de l'étude. Le développement d'une méthode sensible et robuste a offert la possibilité de quantifier le MEHP à des quantités très faibles, de l'ordre du pg, dans des matrices biologiques complexes. Ainsi, le MEHP a pu être dosé à un niveau basal dans des villosités placentaires issues de placentas à terme. Les résultats obtenus ont montré que la quantité de MEHP retrouvée dans les villosités placentaires est très faible par rapport à celle présente dans d'autres tissus. Au cours de la grossesse, le MEHP peut avoir été oxydé et hydroxylé en différents métabolites, non dosés lors de l'étude, ce qui expliquerait la quantité relativement faible de MEHP retrouvée dans les villosités. Le dosage de ce phtalate et de ces principaux métabolites dans des villosités placentaires à différents stades de la grossesse permettrait d'observer une éventuelle accumulation ou dégradation de ce dernier.



# **Analyse lipidomique globale dans les cellules JEG-3**

## I. Introduction

Les lipides sont des molécules essentielles à l'organisme notamment de par leur rôle fonctionnel (signalisation cellulaire et stockage énergétique) et structural (formation des membranes biologiques). De fait, une dérégulation du métabolisme lipidique pourrait avoir de graves répercussions sur les fonctions cellulaires. Dans le cas des cellules trophoblastiques, cellules clés du placenta, une perturbation du lipidome pourrait entraîner des effets délétères sur le développement de cet organe et induire des complications de la grossesse et de la croissance fœtale. Dans le placenta, le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  régule l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. L'activation de ce dernier par un ligand exogène non naturel, le MEHP, pourrait donc engendrer une dérégulation du métabolisme lipidique placentaire. Afin de mesurer cette perturbation potentielle, une analyse lipidomique globale a été menée sur la lignée cellulaire JEG-3 incubée ou non en présence de MEHP.

## II. Matériel et méthodes

L'analyse lipidomique a été effectuée, selon une méthode déjà mise en place au laboratoire. Cette dernière comporte une étape d'extraction liquide/liquide suivie d'une analyse par UPLC-MS.

### A. Préparation des échantillons

L'analyse lipidomique a été réalisée sur 20 culots de cellules JEG-3 incubées avec le MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  et 20 culots cellulaires contrôles, incubés avec le DMSO, durant 72 h. Les culots cellulaires ont été repris dans l'eau et broyés mécaniquement à l'aide d'un broyeur automatique (Precellys®24-Dual, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). Une partie du surnageant a été prélevée (20  $\mu\text{L}$ ) afin d'effectuer le dosage de protéines tandis que le reste (1 mL) a été utilisé pour l'analyse lipidomique globale. L'extraction a été fractionnée afin d'accroître le rendement. Ainsi, les lipides ont été extraits deux fois à l'aide d'un mélange MTBE/MeOH/H<sub>2</sub>O en proportion 10/3/2,5 (v/v/v) contenant 0,01 % de BHT (m/v). Après centrifugation à 3 000 rpm pendant 10 min, les phases organiques ont été regroupées puis évaporées à sec sous pression réduite à 45 °C (SpeedVac®, Thermo Fisher Scientific, France). Les résidus secs ont été repris par un mélange ACN/IPr/CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O en proportion 30/30/20/10 (v/v/v/v), avant d'être analysés à l'aide du système UPLC-MS.

## B. Analyse UPLC-MS

L'approche analytique choisie, de type CLASS, combine une séparation chromatographique à une détection en spectrométrie de masse à haute résolution. La séparation chromatographique, fondée sur le caractère hydrophobe des lipides, a été réalisée en RPLC (Acquity UPLC®, Waters, Manchester, UK), sur une colonne CSH™ C<sub>18</sub> (100 x 2,1 mm ; 1,7 µm) équipée d'une précolonne CSH™ C<sub>18</sub>. La colonne a été maintenue à 50 °C pendant toute la durée de l'analyse. Une phase mobile constituée d'un mélange de solvants A, H<sub>2</sub>O/ACN 60/40 (v/v) et d'un mélange de solvants B, ACN/IPr 10/90 (v/v) contenant tous deux de l'acétate d'ammonium à 10 mmol.L<sup>-1</sup> a été utilisée. Le débit de phase mobile a été fixé à 0,4 mL.min<sup>-1</sup> et la durée d'analyse à 15 min suivant le gradient présenté ci-dessous (Figure 62) :

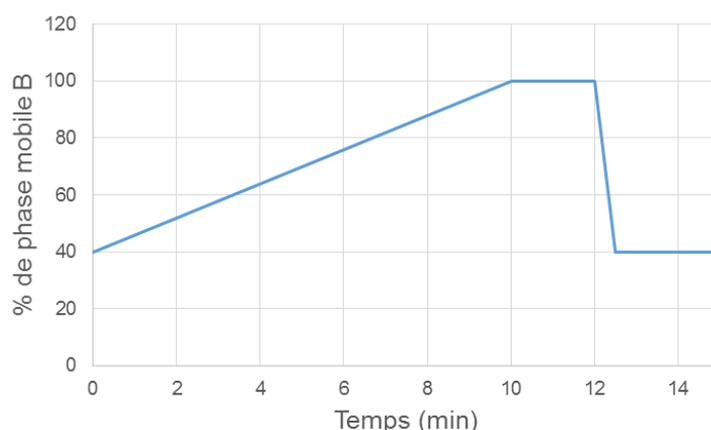


Figure 62 : Gradient chromatographique utilisé pour l'analyse lipidomique globale par UPLC-ESI-MS

Les molécules ont été analysées sur un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation ESI et d'un analyseur hybride Q-TOF à injection orthogonale (Synapt® G2 High Definition MS™, Waters, Manchester, UK). En raison de la diversité chimique et structurale des lipides, l'ionisation a été effectuée en mode positif (ESI+) et négatif (ESI-). Les paramètres de source ont été fixés comme suit :

- tension du capillaire : 3,0 kV en ESI+, 2,4 kV en ESI- ;
- tension du cône d'extraction : 4 V pour les deux modes ;
- tension du cône d'échantillonnage : 30 V en ESI+, 45 V en ESI- ;
- débit d'azote pour la désolvatation : 1 000 L.h<sup>-1</sup> pour les deux modes ;
- débit d'azote au niveau du cône d'échantillonnage : 20 L.h<sup>-1</sup> pour les deux modes ;
- température de désolvatation : 550 °C pour les deux modes ;
- température de source : 120 °C pour les deux modes.

Pour les deux polarités d'ionisation le spectromètre de masse a été utilisé dans le mode résolution (20 000 FWHM), sur une gamme de  $m/z$  allant de 50 à 1 000 Th. Le temps d'acquisition par scan a été fixé à 0,1 s et l'intervalle entre chaque scan à 0,01 s. Une solution de leucine enképhaline (Lock-Spray™) a été utilisée comme référence externe afin de compenser la dérive de mesure de l'analyseur.

### C. Design expérimental

Afin d'assurer la validité de l'analyse UPLC-MS, un contrôle qualité (QC 1/1), constitué d'un mélange équivolumétrique de chaque échantillon, a été préparé. Une partie de ce dernier a été diluée au tiers et au sixième afin d'obtenir les QC 1/3 et QC 1/6. Le QC 1/1 a été injecté en amont de l'analyse afin de conditionner la colonne chromatographique et ainsi garantir la reproductibilité des temps de rétention et des aires des pics. Des blancs d'extraction, contenant uniquement de l'eau, ont été préparés comme témoins négatifs et ont subi la même procédure d'extraction et d'analyse que les échantillons biologiques. Des blancs analytiques constitués de phase mobile ont également été injectés afin de déceler d'éventuelles impuretés. Un mélange de lipides standards (composition en Annexe 1) a également été injecté afin de contrôler les temps de rétention et les aires des lipides en amont de l'analyse des échantillons. L'ensemble des échantillons biologiques, QCs, blancs d'extraction, blancs d'analyse et mélange de lipides standards a été analysé à intervalle régulier et de sorte que leur ordre d'injection soit indépendant de leur nature.

### D. Prétraitement des données

Les fichiers au format raw (format du constructeur Waters) obtenus à l'issue des analyses UPLC-MS, ont été convertis au format mzData à l'aide du logiciel massWolf fonctionnant sous l'environnement R<sup>337</sup>. Les données ont ensuite été prétraitées par le logiciel XCMS suivant quatre étapes : filtration et détection des pics, appariement, correction des  $t_R$  et intégration. Les matrices de données obtenues à l'issue du prétraitement, représentant l'ensemble des variables ( $m/z$ ,  $t_R$ ) caractérisées par leurs intensités respectives pour chaque échantillon analysé, ont été normalisées en vue d'effectuer les analyses statistiques multivariées. Pour ce faire, une normalisation inter-échantillons par régression locale (loess) a été réalisée afin de corriger la fluctuation du signal due à l'encrassement de la source d'ionisation au fil des injections. Une normalisation intra-échantillon par transformation au  $\log_{10}$ , centrage à la médiane et redimensionnement Pareto a été effectuée afin de diminuer l'influence du bruit de fond au profit de celle des variables d'intérêt, pour les deux matrices en ESI+ et ESI-. Les variables ont ensuite été filtrées pour ne retenir que celles remplissant les conditions

suivantes : le CV déterminé à partir des injections du QC 1/1 est inférieur ou égal à 30 % et le coefficient de corrélation ( $r$ ) entre taux de dilution des QCs (1/1, 1/3 et 1/6) et intensité du signal est égal ou supérieur à 0,7.

#### E. Analyses statistiques multivariées

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SIMCA-P<sup>+</sup> 13.0.3 (Umetrics, Umea, Suède). Une première étape a consisté à réaliser une analyse statistique non supervisée de type PCA afin de rechercher la direction de plus grande variance entre les échantillons. La visualisation sous forme de *score plots* des modèles ainsi créés a permis d'observer la répartition naturelle des échantillons. Par la suite, des analyses supervisées de type PLS-DA et OPLS-DA ont été effectuées afin de générer des nouveaux modèles statistiques permettant de rechercher les variables discriminantes. Les modèles créés en PLS-DA ont été validés par un test de permutation à 999 itérations et un test CV-ANOVA. Les modèles construits par OPLS-DA ont, quant à eux, été validés par un test CV-ANOVA et par validation externe. Pour ce faire, un modèle d'apprentissage, contenant 75 % des échantillons de chaque groupe a été construit à nouveau par OPLS-DA et les 25 % d'échantillons restants dans chaque groupe ont été utilisés pour tester la capacité prédictive du modèle.

À l'issue de ces analyses, les variables ont été considérées discriminantes seulement si le  $|p(\text{corr})|$  et le score VIP qui leurs sont associés sont respectivement égaux ou supérieurs à 0,5 et 1. Afin de vérifier que l'intensité de chacune des variables discriminantes, prises indépendamment les unes des autres, est significativement différente entre les deux groupes d'échantillons, un test univarié (Wilcoxon) suivie d'une correction FDR des *p-values* ont été appliqués.

#### F. Annotation des variables

Suite aux différentes analyses statistiques, les variables retenues ont été annotées par interrogation de la base de données METLIN. Une erreur de 5 ppm a été tolérée sur les valeurs de  $m/z$ . L'annotation de ces variables a été confirmée par l'étude des temps de rétention. La corrélation entre le  $t_R$  d'un lipide et son ECN a, en effet, permis de calculer des  $t_R$  théoriques pour chaque variable annotée comme lipide. Une erreur de 15 % a été acceptée.

#### G. Courbe ROC

Une fois les lipides annotés, il est apparu important d'évaluer la capacité prédictive de ces derniers à pouvoir distinguer les échantillons incubés avec le MEHP de ceux incubés en l'absence de ce composé. En d'autres termes, il s'agit de vérifier si cet ensemble de lipides

suffit à discriminer les échantillons et s'il permet de prédire l'appartenance de groupe d'un échantillon inconnu (« pouvoir diagnostique »). Pour ce faire, une analyse par SVM a été réalisée à partir d'une matrice ne contenant que les lipides discriminants, en utilisant 80 % des échantillons pour l'apprentissage et les 20 % restants pour tester l'algorithme généré. Un rééchantillonnage automatique a été effectué autant de fois que possible (402 itérations) afin d'augmenter la fiabilité des résultats. La performance de l'algorithme a été évaluée par la construction graphique de courbes ROC dont l'AUC a été calculée.

### III. Résultats

#### A. Analyse UPLC-MS

Le rendement d'extraction moyen pour l'ensemble des lipides est de 85 %. La méthode chromatographique mise au point au laboratoire permet la séparation des classes lipidiques en moins de 15 min (Figure 63).

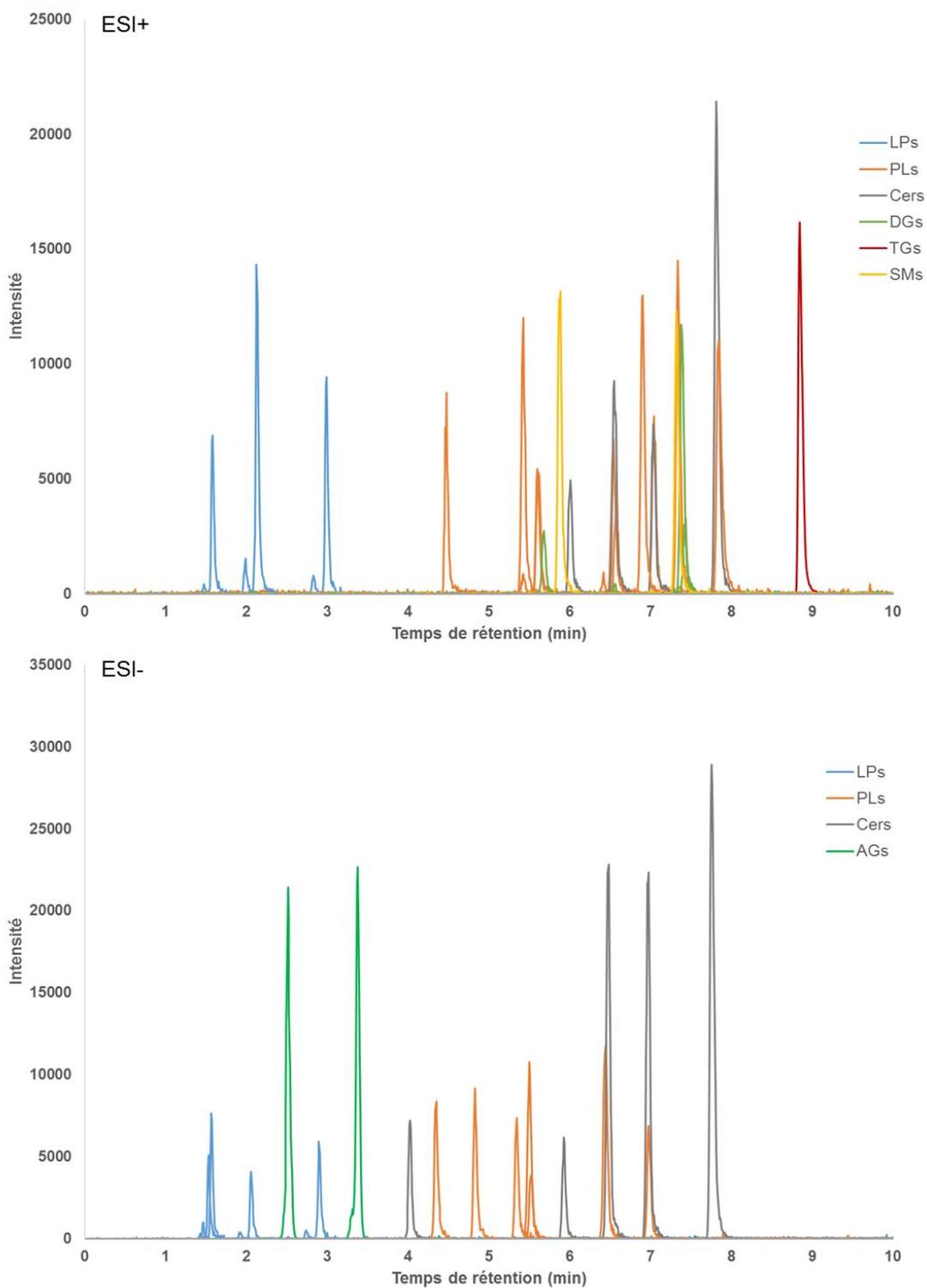


Figure 63 : Séparation chromatographique du mélange de lipides standards  
 LPs : lysophospholipides, PLs : glycérophospholipides, Cers : céramides, DGs : diacylglycérols,  
 TGs : triacylglycérols, AGs : acides gras, SMs : sphingolipides

La majorité des classes de lipides est détectée dans les deux modes d'ionisation. Seuls les acides gras (AGs) sont spécifiquement ionisés en ESI- et les glycérolipides (DGs, TGs) en ESI+.

## B. Prétraitement des données

Un encrassement de la source d'ionisation entraînant une fluctuation de l'intensité du signal a été observé en ESI+ (Figure 64) mais pas en ESI- (Figure 65). Une régression locale de type loess a donc été appliquée sur les données recueillies en ESI+.

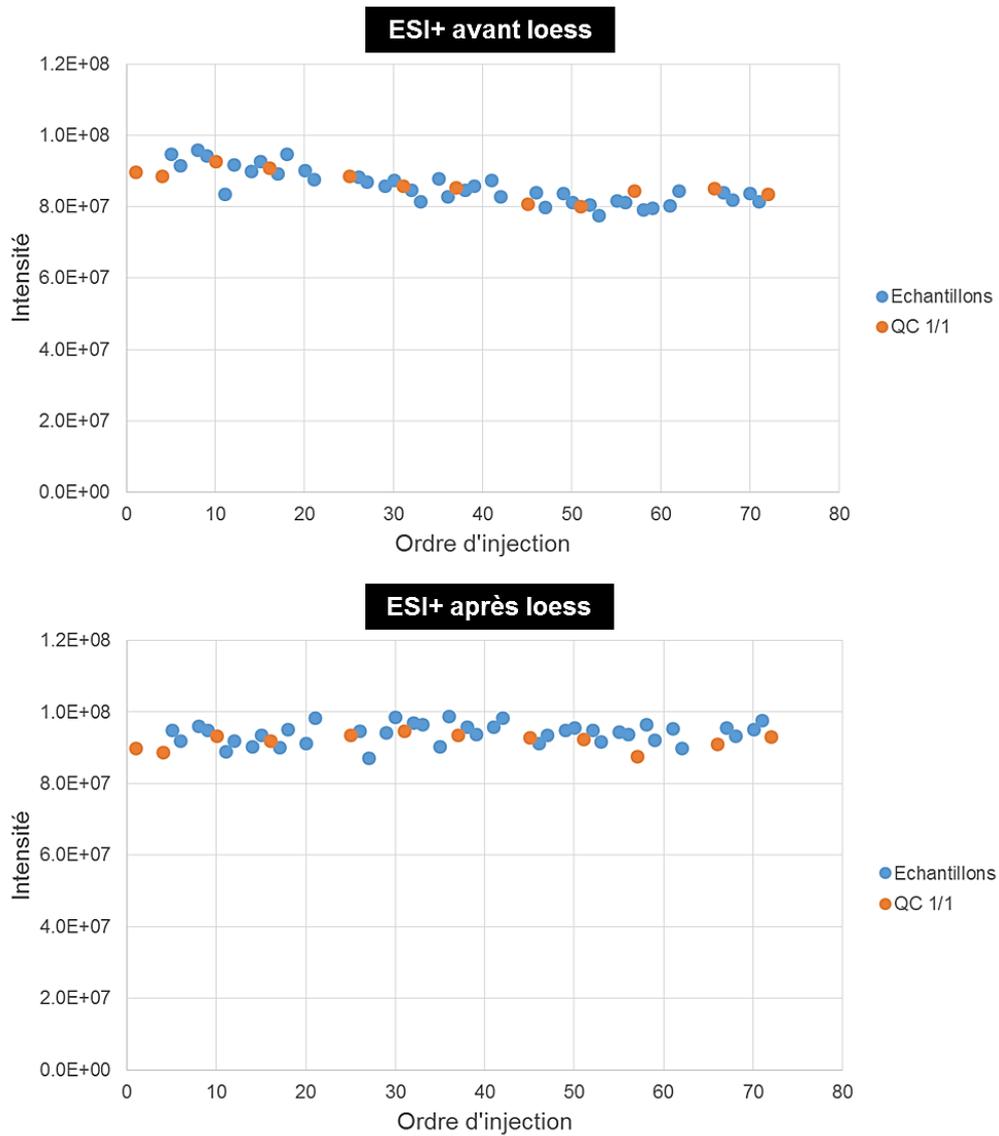


Figure 64 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection, en ESI+

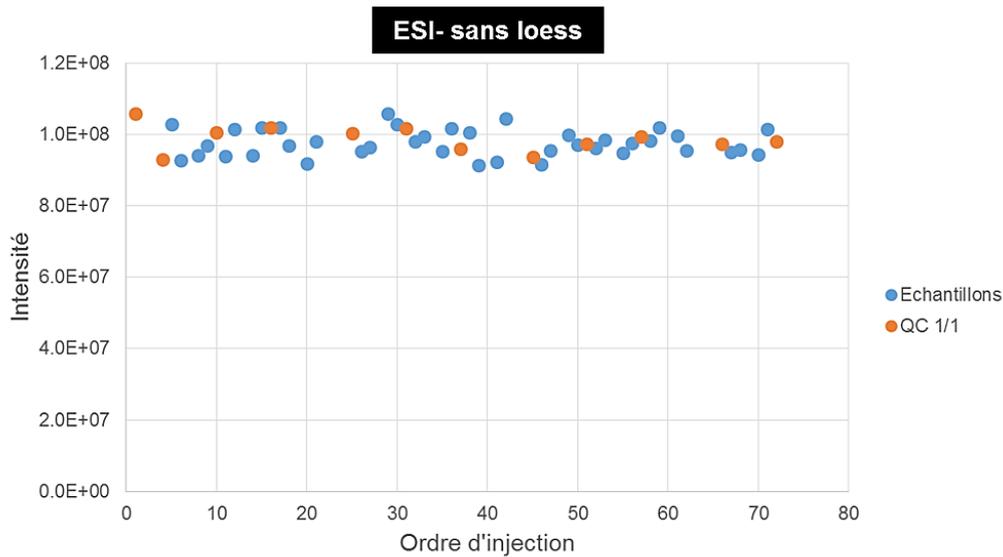


Figure 65 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection, en ESI-

### C. Analyses statistiques multivariées

Des analyses statistiques multivariées ont été réalisées sur les deux matrices de données générées en ESI+ et ESI-. En ESI+, la direction de plus grande variance coïncide avec celle correspondant à la répartition des échantillons en deux clusters qui correspondent aux deux groupes d'échantillons (Figure 66). En ESI-, la répartition en clusters, bien que moins nette est tout de même observée. Cependant, quel que soit le mode d'ionisation, les paramètres  $R^2$  et  $Q^2$  correspondant aux modèles PCA créés, ne traduisent qu'une capacité explicative modérée et une capacité prédictive insuffisante de ces derniers ( $R^2 = 0,43$ ,  $Q^2 = 0,25$  en ESI+ et  $R^2 = 0,48$ ,  $Q^2 = 0,17$  en ESI-).

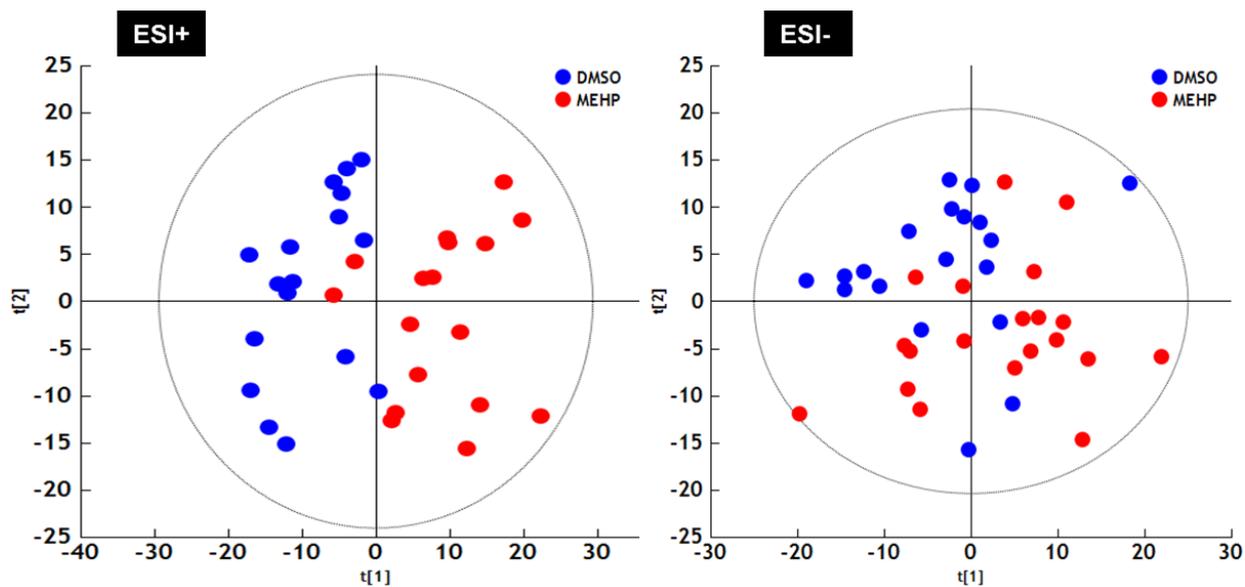


Figure 66 : *Score plots* des modèles construits en PCA en ESI+ et ESI-  
 MEHP : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 72 h ( $< 0,1 \%$  v/v)

Les modèles générés en ESI+ et ESI- par PCA semblent donc indiquer une répartition des échantillons en clusters représentant les deux groupes d'échantillons. Afin de confirmer ce résultat et de le valider ou non, des analyses supervisées ont été réalisées. De fait, un nouveau modèle a été généré en PLS-DA à partir des données obtenues dans chaque mode d'ionisation. Les représentations *score plots* de ces modèles montrent une nette séparation entre le groupe d'échantillons incubés en présence de MEHP et le groupe contrôle, aussi bien en ESI+ qu'en ESI- (Figure 67).

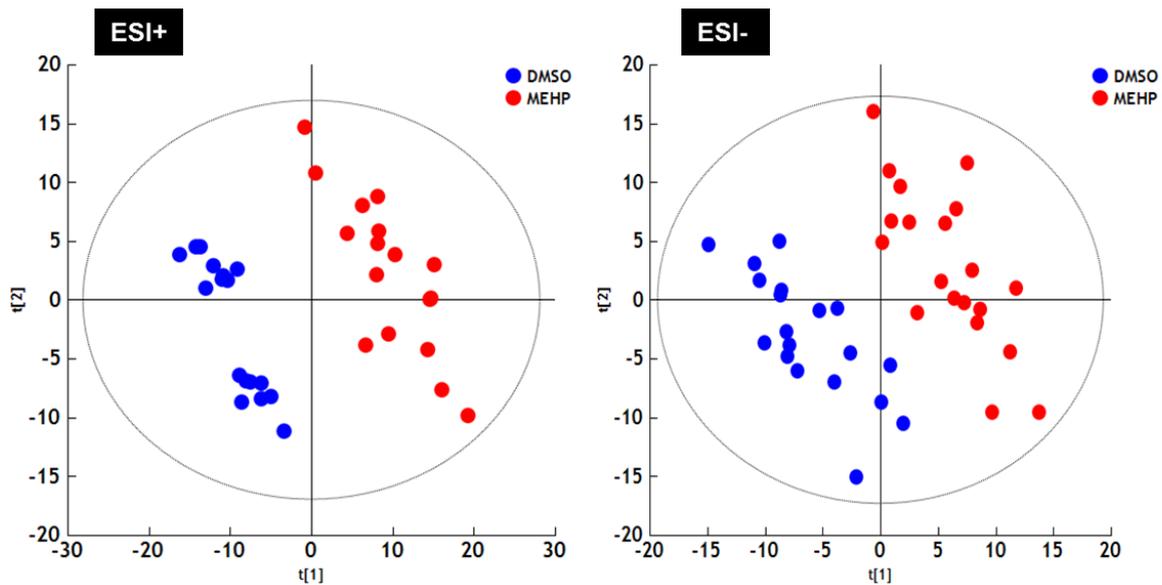


Figure 67 : *Score plots* des modèles générés en PLS-DA, en ESI+ et ESI-  
 MEHP : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 72 h (< 0,1 % v/v)

Les paramètres du modèle en ESI+ indiquent que celui-ci utilise 31 % ( $R^2X$ ) des variables pour expliquer 99 % ( $R^2Y$ ) et prédire 83 % ( $Q^2$ ) de la variabilité. En ESI-, le modèle utilise 45 % des variables pour expliquer 99 % et prédire 90 % de la variabilité. La qualité des modèles construits est donc très bonne. Le test de permutation (999 itérations) et le test CV-ANOVA ( $p\text{-value} = 10^{-9}$  en ESI+ et  $10^{-6}$  en ESI-) confirment la validité des modèles générés en PLS-DA (Figure 68).

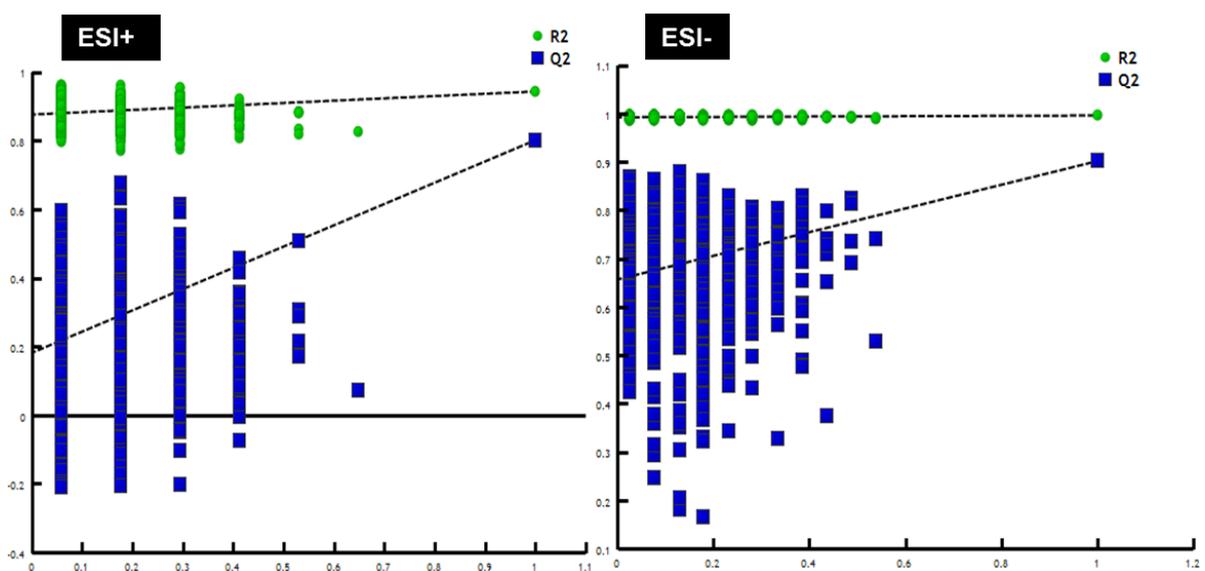


Figure 68 : Représentation des tests de permutation effectués en ESI+ et ESI- sur les modèles construits par PLS-DA

Afin de rechercher les variables discriminantes, c'est-à-dire responsables de la séparation des groupes MEHP/contrôles, pressentie en PCA et confirmée en PLS-DA, des modèles en OPLS-DA ont été créés en ESI+ et ESI-. La représentation des *score plots* de ces modèles confirme la séparation des groupes dans les deux modes d'ionisation (Figure 69). Les performances de ces modèles ont été évaluées par un test CV-ANOVA et par validation croisée.

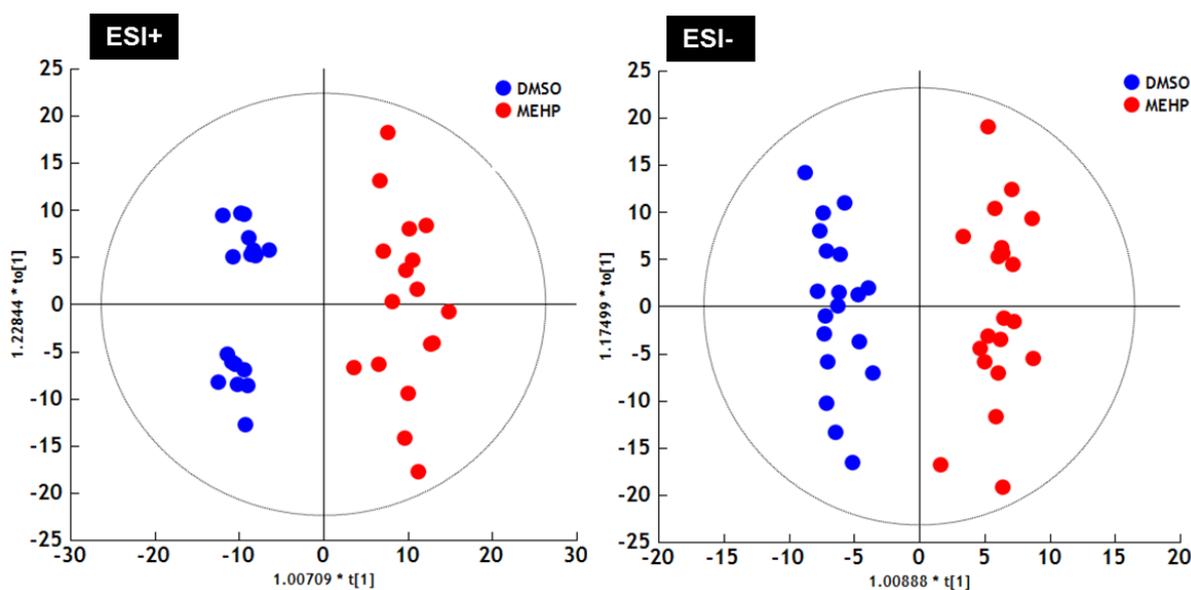


Figure 69 : *Score plots* des modèles construits par OPLS-DA, en ESI+ et ESI-  
 MEHP : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 72 h ( $< 0,1\%$  v/v)

Ces derniers présentent de très bonnes capacités explicatives et prédictives ( $R^2X = 0,22$ ,  $R^2Y = 0,95$ ,  $Q^2 = 0,77$ ,  $p\text{-value} = 10^{-10}$  en ESI+ et  $R^2X = 0,35$ ,  $R^2Y = 0,95$ ,  $Q^2 = 0,70$ ,  $p\text{-value} = 10^{-8}$  en ESI-). Afin de tester plus précisément le pouvoir prédictif de ces modèles, une validation externe a été effectuée. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un tableau de contingence (Tableau 19). Un taux de bonne classification de 100 % des échantillons tests est obtenu quel que soit le mode d'ionisation.

Tableau 19 : Tableau de contingence obtenu par validation externe en ESI+ et en ESI-

	Nombre d'échantillons	Correct	Groupe MEHP	Groupe DMSO	Non classé
Groupe MEHP	5	100 %	5	0	0
Groupe DMSO	5	100 %	0	5	0
Non classé	0		0	0	0
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>100 %</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<i>p-value</i> (Fisher)	0,004				

L'étape d'apprentissage a été réalisée sur 75 % des échantillons ( $n = 15$ ) et l'étape de test sur les 25 % restants ( $n = 5$ )

La  $p$ -value associée au test de Fisher est inférieure au risque  $\alpha$  de 5 %, traduisant une différence significative entre les groupes « MEHP » et « DMSO » pour les échantillons testés. Les modèles créés en OPLS-DA présentent donc une excellente capacité prédictive, pour les deux modes d'ionisation. Afin de rechercher les variables responsables de la séparation de groupes, la représentation  $S$ -plot de ces modèles a été construite (Figure 70).

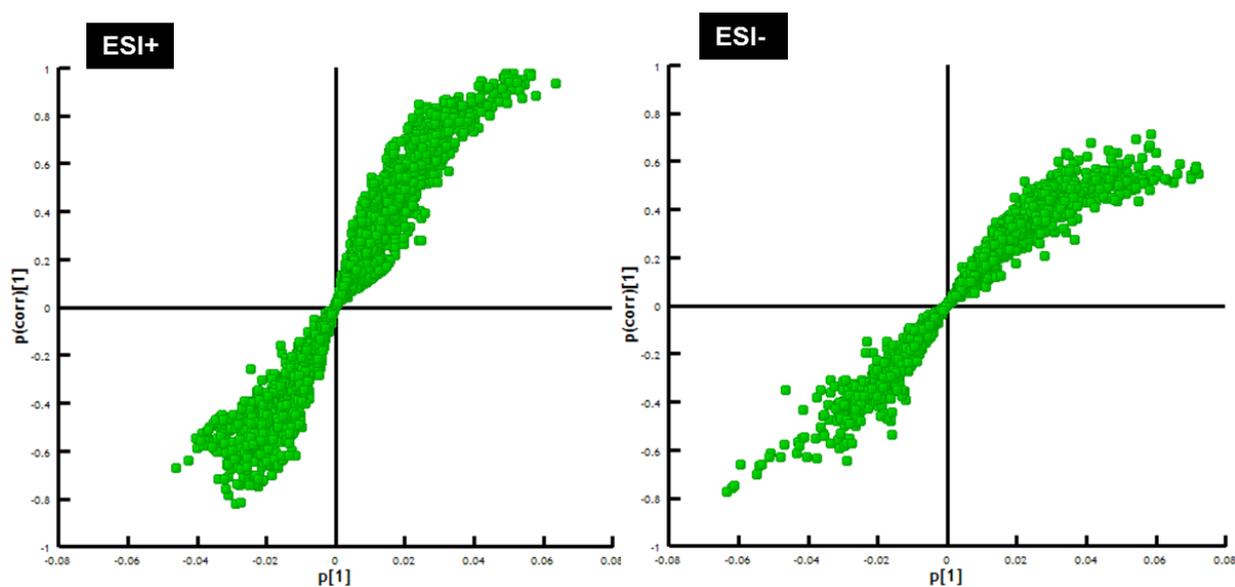


Figure 70 :  $S$ -plots des modèles créés en OPLS-DA, en ESI+ et ESI-

Les variables présentant un  $|p(\text{corr})|$  et un score VIP égaux ou supérieurs à 0,5 et 1, respectivement, ont été retenues. Un ensemble de 459 variables en ESI+ et 132 variables en ESI- ont répondu à ces deux critères. Un test univarié (Wilcoxon) suivie d'une correction FDR des  $p$ -values ont été appliqués sur ces variables afin de confirmer que l'intensité de chacune d'elles, prises indépendamment, est significativement différente d'un groupe à l'autre. Au total, 428 variables en ESI+ et 104 en ESI- diffèrent significativement ( $p$ -value < 0,05) par leur intensité entre les groupes d'échantillons incubés en présence de MEHP et les groupes d'échantillons contrôles.

#### D. Annotation des variables

Les variables précédentes ont été annotées par interrogation des bases de données METLIN et LIPID MAPS, en utilisant une tolérance inférieure ou égale à 5 ppm sur la valeur  $m/z$ . En ESI+, 139 variables ont été annotées comme lipides pour 29 en ESI-. Il s'agit pour l'essentiel de glycérolipides et de glycérophospholipides. L'annotation des variables a été

confirmée par le temps de rétention à l'aide de la relation linéaire établie entre ECN et  $t_R$  à partir du mélange de lipides standards (Figure 71).

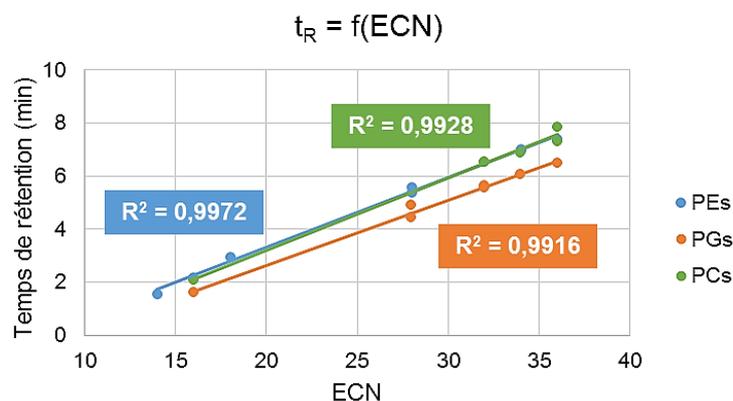


Figure 71 : Relation entre le temps de rétention  $t_R$  et l'ECN pour trois sous-classes de glycérophospholipides contenus dans le mélange de lipides standards  
 PEs : phosphatidyléthanolamines, PGs ; phosphatidylglycérols, PCs : phosphatidylcholines,  $\text{ECN} = \text{CN} - 2n$ , avec CN nombre de carbones et N nombre d'insaturations

Cette relation a permis de confirmer l'annotation de 120 des 139 variables en ESI+ et 14 des 29 variables en ESI-. Après élimination des variables redondantes, présentes sous forme de différents adduits ou retrouvées en ESI+ et ESI-, un total de 132 lipides a été annoté (Tableau 20).

Tableau 20 : Annotation et régulation des lipides discriminants entre les cellules incubées avec le MEHP et les cellules contrôles

Classes de lipides	Nombre d'espèces	MEHP vs Contrôles	
		Augmentés	Diminués
TGs	73	+79%	
DGs	15		-29%
MGs	2		-26%
PEs	5 PE-P		-32%
	10 PE	+46% (5)	-25% (5)
	4 LPE		-46%
PCs	12 PC-P		-31%
	5 PC	+53%	
PGs	3		-22%
Cers	3		-33%

Augmentés : lipides dont le taux est augmenté dans les cellules incubées en présence de MEHP  
 Diminués ; lipides dont le taux est diminué dans les cellules incubées en présence de MEHP  
 TGs : triacylglycérols, DGs : diacylglycérols, MGs : monoacylglycérols, PEs : phosphatidyléthanolamines,  
 PCs : phosphatidylcholines, PGs : phosphatidylglycérols, Cers : céramides, PE-P : PE plasmalogènes,  
 LPE : Lyso PE, PC-P : PC plasmalogènes

Les résultats détaillés pour chacun des 132 lipides discriminants sont présentés en Annexe 2.

Sur les 132 lipides discriminants, la majorité appartient à la sous-classe des TGs (57 %). Le taux de ces derniers est fortement augmenté, de 79 %, dans les cellules incubées avec le MEHP. À l'inverse, les autres glycérolipides, DGs et MGs, sont diminués de 25-30 % dans ces cellules. La plupart des autres lipides, appartenant aux classes des glycérophospholipides et des céramides, voient leur taux diminué dans les cellules incubées en présence de MEHP.

### E. Courbe ROC

Dans le but de confirmer la capacité de l'ensemble de ces lipides à discriminer les deux groupes d'échantillons et à prédire l'appartenance de groupe pour des échantillons inconnus (« pouvoir diagnostique »), une première analyse par SVM a été réalisée en ne considérant que les 127 lipides discriminants comme variables. L'AUC moyenne issue de la représentation des courbes ROC de l'algorithme généré (402 itérations) par SVM est de  $0,97 \pm 0,06$ , soit un taux de vrais positifs de 97 % (Figure 72). L'algorithme généré permet donc le classement correct des échantillons inconnus dans leur groupe d'appartenance dans 97 % des cas, en moyenne.

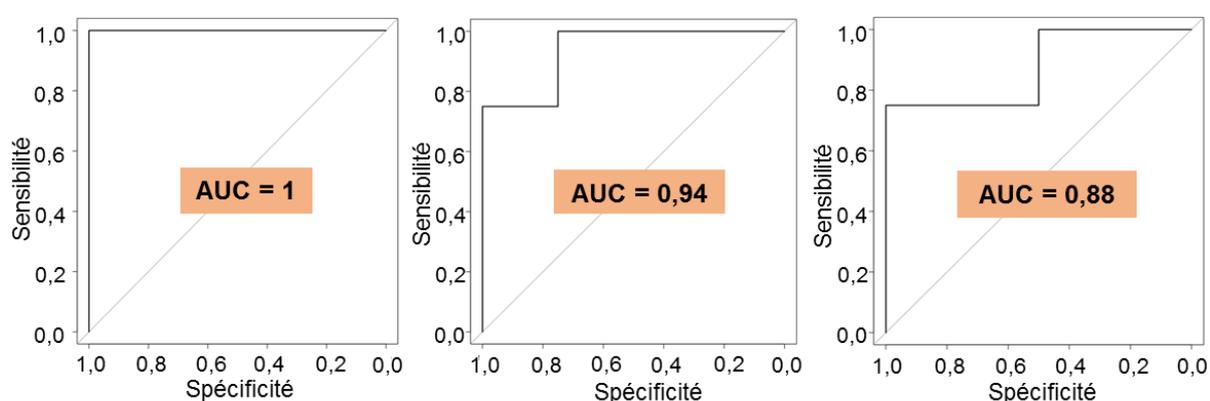


Figure 72 : Trois exemples de représentation de l'algorithme généré par SVM sous forme de courbes ROC. Un algorithme est généré à chaque itération et une courbe ROC est représentée pour chaque valeur d'AUC.

Par la suite, un nouvel algorithme a été généré par SVM pour chaque sous-classe de lipides annotés. Les AUC moyennes issues des représentations des courbes ROC ont été calculées pour chaque sous-classe et sont représentées ci-dessous (Figure 73).

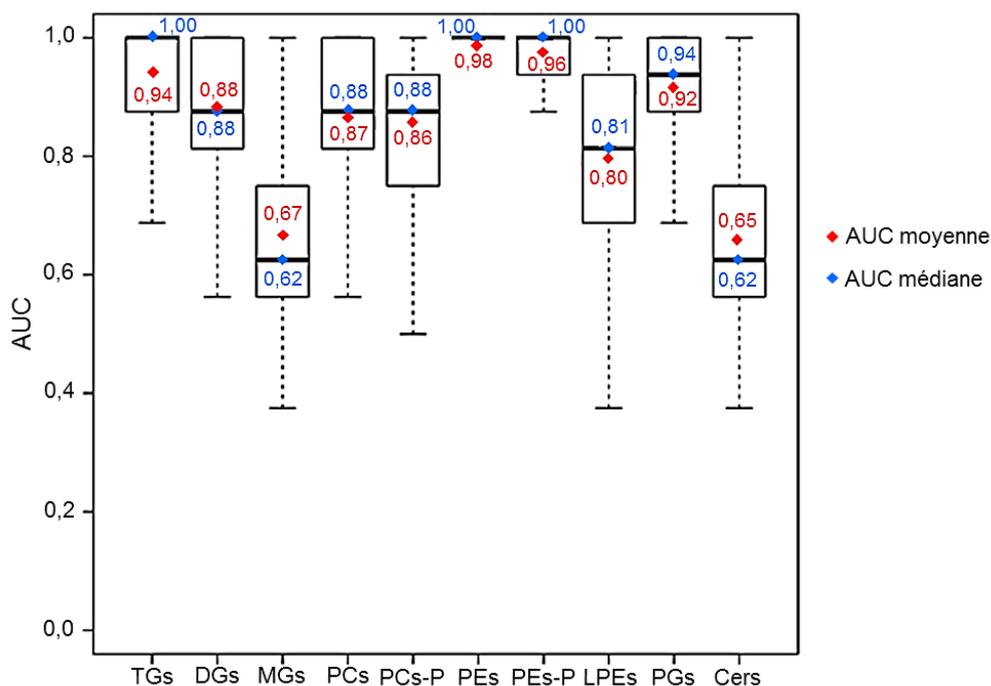


Figure 73 : Boxplots des valeurs d'AUC moyennes et médianes par classe de lipides annotés

Les résultats montrent que les sous-classes de lipides ayant le plus grand pouvoir discriminant sont les TGs, les PEs et les PEs-P (plasmalogènes). À l'inverse, les MGs et les Cers ont moins de poids dans la discrimination des échantillons.

#### IV. Discussion

À la suite d'une incubation de 72 h en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , les cellules JEG-3 présentent donc une forte perturbation de leur profil lipidique. En effet, 132 lipides voient leur taux significativement augmenté ou diminué dans ces cellules.

La classe des TGs semble la plus touchée puisque 73 espèces ont été annotées et leur taux est augmenté de 79 % dans les cellules incubées avec le MEHP. Ces résultats sont concordants avec le rôle connu de PPAR $\gamma$  dans l'obésité et les troubles liés à la dyslipidémie. En effet, PPAR $\gamma$  régule divers processus dépendant des métabolismes lipidique et glucidique telles que l'adipogénèse, la lipogénèse et le stockage de lipides, généralement sous forme de TGs<sup>338</sup>. Diverses études ont mis en évidence un lien entre ce récepteur nucléaire et le taux de TGs. PPAR $\gamma$  est, par exemple, fortement exprimé dans les tissus adipeux et son activation par des ligands spécifiques induit une augmentation de la concentration en TGs dans ces tissus. En 2008, Joose, *et al.* ont montré que, chez des hommes en bonne santé et non obèses, la rosiglitazone, ligand endogène de PPAR $\gamma$ , provoque une perturbation du métabolisme des TGs marquée par une augmentation de leur taux dans le plasma<sup>339</sup>. Une autre étude a montré que, dans le foie, PPAR $\gamma$  régule l'expression de gènes impliqués dans

le métabolisme des TGs<sup>340</sup>. Les résultats de l'analyse lipidomique soulignent ainsi l'implication de PPAR $\gamma$  dans la régulation du métabolisme des TGs de la lignée cellulaire placentaire JEG-3, suite à son activation par le MEHP.

Concernant les DGs, une diminution significative de 29 % de leur taux est observée pour l'ensemble des 15 espèces, dans les cellules incubées avec le MEHP. Le métabolisme des DGs étant directement relié à celui des TGs, l'activation de PPAR $\gamma$  dans ces cellules pourrait également perturber leur métabolisme<sup>341</sup>. Une étude de 2004 par Hegarty *et al.* a montré qu'un nouveau ligand de PPAR $\gamma$ , le tesaglitazar, induit une réduction du taux de DGs dans le foie et le muscle squelettique du rat<sup>342</sup>.

L'analyse lipidomique a également mis en avant une diminution de 26 % du taux de MGs dans les cellules incubées en présence de MEHP.

Les résultats de l'étude lipidomique mettent donc en exergue une perturbation du métabolisme des glycérolipides dans les cellules JEG-3, suite à leur incubation en présence de MEHP. Cette perturbation semble être directement reliée à l'activation de PPAR $\gamma$  par le phtalate. Dans l'organisme, les TGs sont synthétisés par une voie unique faisant intervenir l'enzyme diacylglycérol acyltransférase (DGAT)<sup>198,343</sup>. Cette enzyme permet la formation de TGs à partir de DGs et d'acyl-coenzyme A par estérification du squelette glycérol par un acide gras. À l'inverse, les TGs sont dégradés en DGs et en MGs par la triacylglycérol lipase (TGL) et la lipoprotéine lipase (LPL)<sup>344</sup>. Concernant les DGs, différentes voies de synthèse sont décrites (*Figure 74*). La voie principale provient de l'hydrolyse de l'acide phosphatidique (PA) par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP); le PA étant lui-même produit à partir du glycérol-3-phosphate<sup>198,345,346</sup>. La réaction inverse, conduisant à la dégradation des DGs en PAs est catalysée par la diacylglycérol kinase (DAGK)<sup>347</sup>. Les DGs peuvent également provenir de l'estérification de MGs par la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT), la réaction inverse étant catalysée par la diacylglycérol lipase (DAGL)<sup>341,348</sup>. Comme décrit précédemment, la biosynthèse des DGs est très étroitement liée à celle des TGs par action de la DGAT et TGL. Enfin, les DGs sont des précurseurs de la biosynthèse des glycérophospholipides PEs et PCs<sup>349</sup>.

L'ensemble de ces différentes voies de biosynthèse rend l'interprétation des résultats relativement difficile. Cependant, les résultats ont montré une augmentation marquée du taux de TGs associée à une diminution de celui des DGs. De fait, une attention particulière devrait être portée sur la DGAT, enzyme essentielle à la synthèse des TGs.

Parmi les 132 lipides discriminants, 36 ont été annotés comme glycérophospholipides appartenant aux trois classes : PEs, PCs et PGs.

Les cinq espèces de PCs ont un taux significativement augmenté de 53 % dans les cellules incubées en présence de MEHP. À l'inverse, les trois espèces appartenant à la classe des

PGs ont un taux diminué de 22 % dans ces cellules. Les PEs, quant à elles, ne sont pas régulées de manière homogène puisque la moitié (cinq espèces), voit son taux augmenté de 46 % et l'autre moitié (cinq espèces) diminué de 25 %. Les quatre LPEs, en revanche, ont un taux significativement diminué de 46 % dans les cellules incubées avec le contaminant chimique.

De nombreuses études ont reporté le rôle de PPAR $\gamma$  dans la régulation du métabolisme lipidique mais aucune d'entre elles ne s'est concentrée sur les espèces spécifiques pouvant être perturbées telles que les PCs, les PEs ou les PGs. De fait, l'implication de l'activation de PPAR $\gamma$  sur le métabolisme des glycérophospholipides reste à démontrer. Cependant, l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP conduit à la perturbation du métabolisme des glycérolipides, ce dernier étant étroitement lié à celui des glycérophospholipides, notamment par l'intermédiaire des DGs<sup>346</sup>. En effet, les PEs et les PCs sont synthétisées par la réaction *de novo* d'un DG et d'une éthanolamine ou d'une choline phosphorylée (Figure 74)<sup>350,351</sup>. Les PCs peuvent également être formées par la méthylation d'un PE par la phosphatidyléthanolamine *N*-méthyltransférase (PME) <sup>352,353</sup>. Les PEs peuvent également provenir de la décarboxylation de PSs<sup>354</sup>. Les lysoglycérophospholipides tels que les LPEs et les LPCs sont synthétisés par la rupture d'une chaîne d'acide gras sur le PE et le PC correspondant, par la phospholipase A2 (PLA2)<sup>355</sup>. La voie de synthèse des PGs est différente de celle des autres glycérophospholipides. En effet, elle fait appel à la formation d'un précurseur cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DG), lui-même modifié en phosphatidylglycérol-3-phosphate (PGP) puis, par perte du groupement phosphate, en PG<sup>356,357</sup>.

Les résultats obtenus soulignent donc une perturbation significative du métabolisme des glycérophospholipides des cellules JEG-3 suite à une incubation avec le MEHP et, notamment des PEs, PCs et PGs. Différentes voies de métabolisation, impliquant un grand nombre d'enzymes semblent donc être perturbées suite à l'activation de PPAR $\gamma$  par le phtalate.

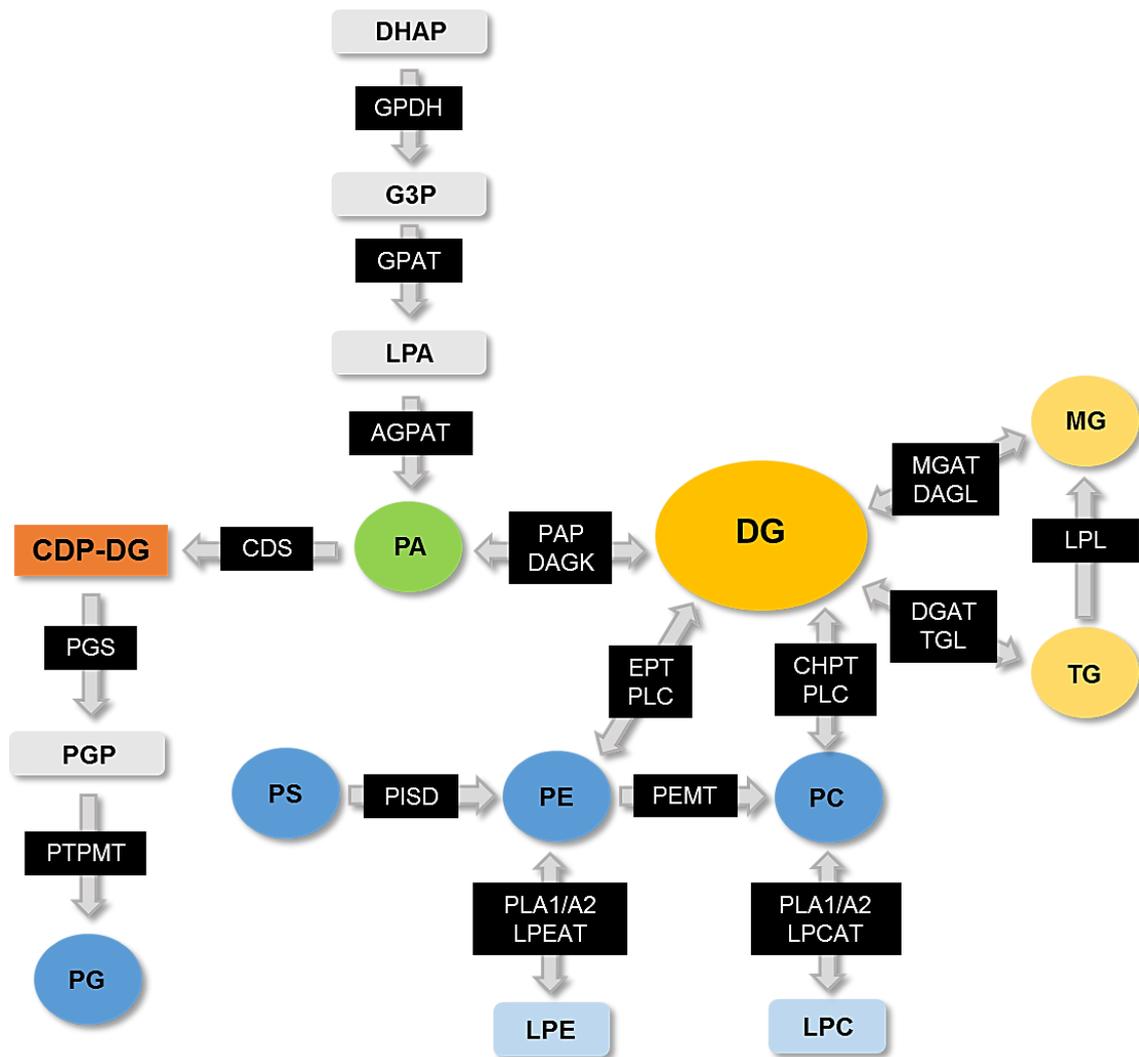


Figure 74 : Schéma non exhaustif du métabolisme des glycérolipides et des glycérophospholipides  
 DHAP : dihydroxycétone phosphate, G3P : Glycérol phosphate, LPA : lyso PA, CDP-DG : cytidine diphosphate-diacylglycérol, PGP : phosphatidylglycérol-3-phosphate, GPDH : glycérol-3-phosphate déshydrogénase, GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase, AGPAT : 1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase, PAP : acide phosphatidique phosphatase, DAGK : diacylglycérol kinase, MGAT : monoacylglycérol acyltransférase, DAGL : diacylglycérol lipase, LPL : lipoprotéine lipase, DGAT : diacylglycérol acyltransférase, TGL : triacylglycérol lipase, CHPT : CDP-choline 1-2 diacylglycérol phosphocholine transférase, EPT : CDP-éthanolamine 1-2 diacylglycérol phosphoéthanolamine transférase, PLC : phospholipase C, PLA2 : phospholipase A2, LPCAT : lysophosphatidylcholine acyltransférase, LPEAT : lysophosphatidyléthanolamine acyltransférase, PEMT : phosphatidyléthanolamine *N*-méthyltransférase, PISD : phosphatidylsérine décarboxylase, CDS : phosphatidate cytidyltransférase, PGS : PG-3-phosphate synthase, PTPMT : PG-3-phosphate phosphatase

Au total, 17 lipides ont été annotés comme plasmalogènes de la sous-classe des PEs (PEs-P) et PCs (PCs-P) et tous ont un taux significativement diminué d'environ 30 % dans les cellules incubées en présence de MEHP. Les plasmalogènes sont des glycérophospholipides possédant une liaison vinyl-éther à la place d'une liaison ester en position *sn-1*<sup>358</sup>. De nombreuses étapes sont nécessaires à la formation des PEs-P et font intervenir différentes enzymes. La première consiste en l'acylation de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), suivie par l'alkylation du groupement acyle afin de former la 1-O-alkyl-DHAP<sup>359</sup>. Des étapes

additionnelles aboutissent à la formation des PEs-P. Les PCs-P sont formées à partir des PEs-P par hydrolyse puis remplacement de la tête éthanolamine par une choline.

Bien qu'aucune étude n'ait mis en évidence un lien entre activation de PPAR $\gamma$  et métabolisme des plasmalogènes, ce dernier est néanmoins dépendant de fonctions peroxysomales. En effet, les enzymes impliquées dans les premières étapes de biosynthèse des plasmalogènes sont localisées dans les peroxysomes<sup>360</sup>. Une étude de Hayashi *et al.* a montré que la synthèse de plasmalogènes est accélérée par accroissement du nombre de péroxysomes sous l'effet des proliférateurs de peroxysomes<sup>361</sup>. Les résultats de notre étude lipidomique semblent donc démontrer pour la première fois une influence directe de l'activation de PPAR $\gamma$  sur le métabolisme des plasmalogènes, dans les cellules placentaires JEG-3.

Enfin, trois lipides discriminants ont été annotés comme céramides et ont un taux significativement diminué de 33 % dans les cellules incubées en présence du contaminant chimique. Jusqu'à présent, aucune étude n'a démontré de lien entre l'activation de PPAR $\gamma$  et le métabolisme des sphingolipides. Néanmoins, en 2008, Holland *et al.* ont montré que, chez le rat, un traitement à la rosiglitazone empêche l'accumulation de Cers dans les muscles<sup>362</sup>. Les résultats de notre étude lipidomique effectuée sur la lignée cellulaire placentaire JEG-3, montrant une diminution du taux de Cers suite à l'activation de PPAR $\gamma$ , semblent donc mettre en évidence l'implication de PPAR $\gamma$  dans le métabolisme des sphingolipides et notamment des Cers.

Le métabolisme des sphingolipides est régulé par un grand nombre d'enzymes, notamment des céramidases et céramide synthase (Figure 75)<sup>363-365</sup>.

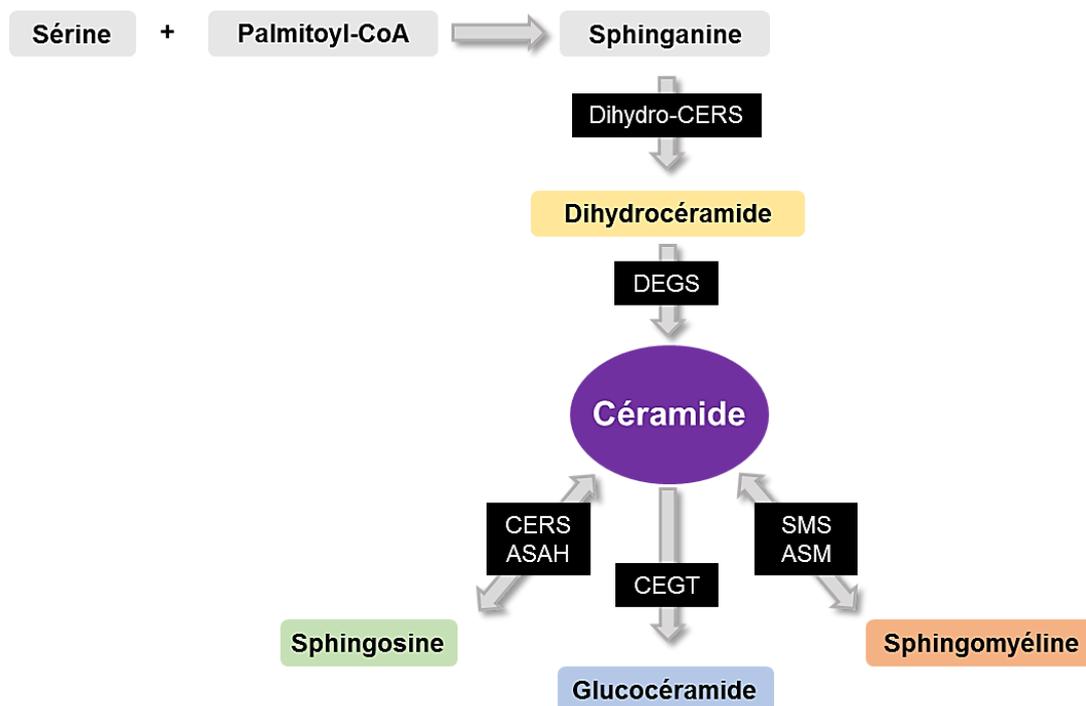


Figure 75 : Schéma non exhaustif du métabolisme des sphingolipides  
 Dihydro-CERS : dihydrocéramide synthase, DEGS : dihydrocéramide désaturase, CERS : céramide synthase,  
 ASAH : céramidase, CEGT : glucosyl céramide synthase, SMS : sphingomyéline synthase,  
 ASM : sphingomyélinase

Les différences significatives observées du taux de certains lipides dans les cellules JEG-3, suite à leur incubation en présence d'un contaminant chimique ligand de PPAR $\gamma$ , représentent la dernière réponse des cellules à ce stimulus. Cette étude permet donc de mettre en évidence un effet important du MEHP sur la concentration de lipides dans la lignée cellulaire étudiée. Cependant, afin de compléter de tels résultats, des approches complémentaires pourraient permettre de comprendre le mécanisme d'action par lequel le métabolisme des lipides est perturbé. En effet, une étude des voies enzymatiques mises en jeu permettrait de mettre en évidence les voies métaboliques perturbées par la présence du MEHP. Dans ce but, une étude par Western Blot a été menée sur la DGAT, afin de comparer la quantité de cette enzyme entre les culots cellulaires incubés avec le MEHP et les culots cellulaires contrôles. Les résultats obtenus n'ayant pas été concluants par manque de spécificité de l'anticorps primaire, une autre approche a été envisagée. De fait, afin de compléter les résultats de l'étude lipidomique, une analyse transcriptomique par RT-qPCR sur certains gènes régulant le métabolisme lipidique a été menée et les résultats sont présentés dans la suite du manuscrit.

## V. Conclusion

L'utilisation d'une approche lipidomique globale combinant une étape d'extraction par LLE, une analyse par UPLC-MS et des analyses statistiques multivariées a permis de mettre en

évidence une perturbation du lipidome des cellules JEG-3 suite à leur incubation en présence de MEHP. Un rendement moyen d'extraction de 85 % a été obtenu, permettant le recueil des lipides à partir des culots cellulaires. La méthode UPLC-MS mise au point au laboratoire a permis de séparer et d'analyser différentes classes de lipides dans les culots cellulaires JEG-3, notamment les glycérolipides, les glycérophospholipides et les sphingolipides. L'utilisation d'analyses statistiques multivariées a permis de rechercher les lipides discriminants entre les deux groupes d'échantillons et d'évaluer leur capacité à prédire l'appartenance de groupe d'un échantillon inconnu. Les résultats de l'analyse lipidomique ont montré une perturbation de différentes classes de lipides et notamment des glycérolipides et des glycérophospholipides. Sur un total de 132 lipides discriminants, 57 % correspondent à des TGs et ont un taux significativement augmenté de 79 % dans les cellules incubées en présence de MEHP. Une accumulation de TGs est donc observée dans ces cellules suite à l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP. Des études métabolomiques menées sur des échantillons tissulaires de placentas prééclampsiques ainsi que sur du sérum, du plasma et des urines de femmes prééclampsiques ont mis en évidence une augmentation significative du taux de TGs, d'acides gras libres et de cholestérol dans ces derniers <sup>59-61</sup>. Au vu des résultats, un rôle potentiel du MEHP comme facteur de risque de la prééclampsie peut être envisagé. Cependant, l'étude ayant été menée sur une lignée cellulaire cancéreuse, les conséquences qui peuvent en être tirées pour le placenta sont probablement limitées. En effet, ces cellules étant issues d'un choriocarcinome, leur métabolisme est perturbé et différent de celui propre aux cellules du placenta <sup>366</sup>. En revanche, dans le cas d'une étude comparative telle que la nôtre, l'utilisation du modèle JEG-3 reste pertinent puisqu'il a permis de mettre en exergue une perturbation importante du lipidome due au MEHP.

Il est à noter qu'aucun lipide appartenant à la classe des acides gras n'a été annoté comme discriminant entre les deux groupes d'échantillons. PPAR $\gamma$  étant très impliqué dans les régulations du métabolisme des acides gras, une analyse centrée sur cette classe et notamment sur les eicosanoïdes, ligands endogènes de PPAR $\gamma$ , apparaît alors pertinente.

# **Analyse des eicosanoïdes dans les cellules JEG-3**

## I. Introduction

Les eicosanoïdes sont des lipides oxydés, dérivés de l'acide arachidonique et ligands endogènes du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et notamment dans la réponse inflammatoire. Au niveau du placenta, l'activation de PPAR $\gamma$  par les eicosanoïdes conduit à l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et particulièrement dans le transport et l'oxydation des acides gras. De fait, les eicosanoïdes semblent réguler leur propre métabolisme par l'intermédiaire de PPAR $\gamma$ . Il apparaît alors intéressant d'évaluer l'effet de l'activation de PPAR $\gamma$  par un ligand exogène, le MEHP, sur le métabolisme des eicosanoïdes au niveau du placenta. Une étude comparative a donc été menée entre des culots cellulaires JEG-3 incubés en présence de MEHP et des culots contrôles. Afin de détecter les molécules à un niveau basal, une méthode d'analyse a été mise au point et validée au préalable par UPLC-MS.

## II. Matériel et méthodes

Un mélange de 23 eicosanoïdes standards et de neuf étalons internes (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA), représentatifs des différentes familles, a été utilisé afin de mettre au point la méthode d'analyse. De plus, deux lipides oxydés dérivés non pas de l'acide arachidonique mais de l'acide linoléique (C18:2) ont également été ajoutés au mélange standard. La liste détaillée de ce mélange est présentée en Annexe 3.

Après mise au point et validation de la méthode, l'analyse des eicosanoïdes a été réalisée sur 15 culots cellulaires incubés en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  et 15 culots contrôles, incubés avec du DMSO.

### A. Mise au point de la méthode d'analyse

La méthode d'analyse des eicosanoïdes comprend une étape d'extraction par SPE puis une séparation chromatographique en UPLC suivie d'une détection par MS sur un spectromètre de masse équipé d'une source ESI et d'un analyseur Q-TOF (Synapt® G2 High Definition MS<sup>TM</sup>, Waters, Manchester, UK). Les eicosanoïdes sont détectés en mode d'ionisation négatif. Dans un premier temps, certains paramètres de chromatographie ont été ajustés afin d'obtenir la meilleure séparation possible des différents eicosanoïdes. Un plan d'expérience a ensuite été réalisé sur quatre paramètres de MS afin d'optimiser la détection des molécules. L'extraction par SPE a été mise au point afin d'obtenir des rendements maximums pour chacun des eicosanoïdes. La méthode ainsi développée a été validée par

l'évaluation de l'effet matrice, de la linéarité, de la répétabilité/reproductibilité, de la LOD et de la LOQ.

## 1. Analyse par UPLC-MS

En fonction de leur voie de synthèse, les eicosanoïdes appartiennent à l'une des familles suivantes : les leucotriènes (LTs), les prostaglandines (PGs), les thromboxanes (TXs), les acides hydroxyeicosatétraoïques (HETEs), les acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHETs) et les acides époxyeicosatriénoïques (EETs). Les acides hydroxyoctadécadiénoïques (HODEs) sont, quant à eux, dérivés de l'acide linoléique. Les eicosanoïdes regroupent un grand nombre de molécules isomères et isobares, notamment les HETEs, les DHETs et les EETs, rendant particulièrement difficile leur analyse. D'après la littérature et les propriétés physico-chimiques de ces molécules, la méthode de séparation la plus appropriée est la chromatographie de partage à polarité de phase inversée. Le mélange d'eicosanoïdes standard a donc été séparé par RPLC, sur une colonne BEH™ C<sub>18</sub> (2,1 mm x 100 mm ; 1,7 μm) équipée d'une précolonne BEH™ C<sub>18</sub> (Waters Acquity UPLC System, Manchester, UK). La phase mobile utilisée a été choisie à partir des données bibliographiques et est constituée d'un mélange H<sub>2</sub>O/ACN 70/30 (v/v) + 0,1 % d'acide acétique pour le solvant A et d'un mélange ACN/IPr 50/50 (v/v) + 0,02 % d'acide acétique pour le solvant B<sup>240,242,367</sup>. En sortie de colonne, les eicosanoïdes ont été ionisés par électronébulisation en mode négatif puis analysés à l'aide d'un Q-TOF (Synapt® G2 High Definition MS™, Waters, Manchester, UK). Certains paramètres chromatographiques et de spectrométrie de masse ont été ajustés afin d'améliorer la séparation des molécules et d'optimiser leur détection.

### 1.1. Ajustement des paramètres de chromatographie

Différentes températures de colonnes ainsi que différents débits et gradients de phases mobiles ont été testés afin d'obtenir une bonne séparation des 25 eicosanoïdes du mélange standard. Les paramètres ont été choisis afin obtenir le meilleur compromis entre résolution, temps d'analyse et sensibilité. Pour ce faire, des débits de 0,3 à 0,5 mL.min<sup>-1</sup> ont été testés ainsi que des températures de colonnes de 30 à 60 °C (Tableau 21). Le mélange standard a été injecté à 10 μmol.L<sup>-1</sup>, correspondant à la concentration individuelle des eicosanoïdes dans le mélange, et différents gradients d'élution ont été testés.

Tableau 21 : Protocole suivi pour ajuster la température de colonne et le débit de phase mobile

Essai	Débit (mL.min <sup>-1</sup> )	Température colonne (°C)
1	0,3	30
2	0,4	30
3	0,5	30
4	0,3	40
5	0,4	40
6	0,5	40
7	0,3	50
8	0,4	50
9	0,5	50
10	0,3	60
11	0,4	60
12	0,5	60

### 1.2. Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse

Sept paramètres principaux peuvent être ajustés sur la source ESI du spectromètre de masse afin d'optimiser l'étape d'ionisation: les tensions du capillaire, du cône d'extraction et du cône d'échantillonnage, les températures de source et de désolvatation, le débit d'azote au niveau cône d'échantillonnage et pour la désolvatation. Des valeurs standards sont généralement indiquées par le constructeur mais peuvent être adaptées en fonction du type de molécules étudiées. Parmi ces paramètres, le choix du débit d'azote est étroitement dépendant de la nature et du débit de la phase mobile chromatographique. Les valeurs retenues pour le débit d'azote au niveau du cône d'échantillonnage et pour la désolvatation ont donc été fixées d'après les conditions chromatographiques définies. De plus, sur l'appareil utilisé, la tension du cône d'extraction n'a que très peu d'influence sur la sensibilité de la détection. De ce fait, seulement quatre paramètres ont été optimisés : la tension du capillaire, la tension du cône d'échantillonnage, la température de source et la température de désolvatation. Afin d'évaluer au mieux l'effet de ces paramètres sur la sensibilité de la détection, un plan d'expérience a été réalisé. En effet, les différents paramètres étudiés ne sont pas forcément indépendants les uns des autres ; les ajuster individuellement peut alors empêcher l'obtention des valeurs optimales. Les plans d'expérience permettent de déterminer les paramètres significatifs, de réduire le nombre d'essais, de déterminer les interactions entre les différents paramètres et d'obtenir les valeurs optimales de ces paramètres.

Un plan composite centré a été préféré car il s'agit du plan de surface de réponse le plus utilisé et le plus adapté à l'étude. Le plan composite a été réalisé sous la forme de trois blocs orthogonaux, permettant ainsi d'estimer les termes du modèle et les effets de blocs indépendamment (biais dû à l'ordre d'injection). Des bornes ont été fixées pour chacun des paramètres étudiés, d'après les conseils fournis par le constructeur, et au total cinq niveaux ont été testés (Tableau 22).

Tableau 22 : Niveaux des facteurs introduits dans le plan composite centré

		<b>Niveaux</b>				
<b>Paramètres</b>		<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
A	Tension du capillaire (kV)	2,00	2,25	2,50	3,00	3,50
B	Tension du cône d'échantillonnage (V)	30	32	35	40	45
C	Température de source (°C)	100	110	120	130	150
D	Température de désolvatation (°C)	200	300	400	500	600

À partir du domaine expérimental choisi, une matrice d'essais a été générée à l'aide du logiciel *JMP Statistical Discovery™*. Cette matrice a été décomposée en trois blocs orthogonaux comprenant chacun 10 essais (Tableau 23). Les trois blocs ont été testés à un jour d'intervalle les uns des autres. De plus, les interactions de premier ordre ainsi que les termes carrés ont été évalués. Les interactions de premier ordre permettent d'estimer la dépendance des paramètres les uns avec les autres et les termes carrés servent à déterminer si la réponse d'un paramètre est linéaire.

Tableau 23 : Matrice des essais du plan composite centré à 4 facteurs et 5 niveaux

Essais	Bloc	A	B	C	D
1	1	1	-1	-1	-1
2	1	0	0	0	0
3	1	1	-1	1	1
4	1	1	1	-1	1
5	1	1	1	1	-1
6	1	-1	1	1	1
7	1	0	0	0	0
8	1	-1	1	-1	-1
9	1	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1	-1
11	2	-1	-1	-1	-1
12	2	1	-1	-1	1
13	2	1	1	-1	-1
14	2	-1	1	-1	1
15	2	-1	-1	1	1
16	2	0	0	0	0
17	2	1	-1	1	-1
18	2	0	0	0	0
19	2	1	1	1	1
20	2	-1	1	1	-1
21	3	0	0	0	-2
22	3	0	0	0	2
23	3	0	0	2	0
24	3	-2	0	0	0
25	3	0	2	0	0
26	3	0	-2	0	0
27	3	0	0	0	0
28	3	2	0	0	0
29	3	0	0	-2	0
30	3	0	0	0	0

A : tension du capillaire, B : tension du cône d'échantillonnage, C : température de la source d'ionisation, D : température de désolvation

Pour chacun des 30 essais, la même quantité d'acide arachidonique a été injectée et l'aire sous le pic chromatographique a été relevée et utilisée comme paramètre de réponse. À partir des résultats obtenus, les effets de chaque facteur, des interactions de premier ordre et des termes carrés ont été calculés et les valeurs optimales théoriques des quatre facteurs ont été estimées. Ces valeurs ont ensuite été validées expérimentalement.

## 2. Extraction sur phase solide

L'extraction des eicosanoïdes par SPE a été mise au point en s'appuyant sur les données bibliographiques <sup>368-370</sup> et les informations obtenues auprès du fournisseur. De fait, les supports Oasis® HLB (1 cc, 30 mg, 30 µm) ont été choisis. Plusieurs solvants ont été testés pour les différentes étapes (percolation, lavage, élution, reprise) afin d'obtenir un rendement maximal pour chacun des eicosanoïdes. Dans un premier temps, les conditions de percolation

et de lavage ont été testées avec différentes proportions d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH (Figure 76). Les conditions de reprise avant injection dans le système UPLC-MS ont également été évaluées, ainsi que l'ajustement du pH de la solution de percolation.

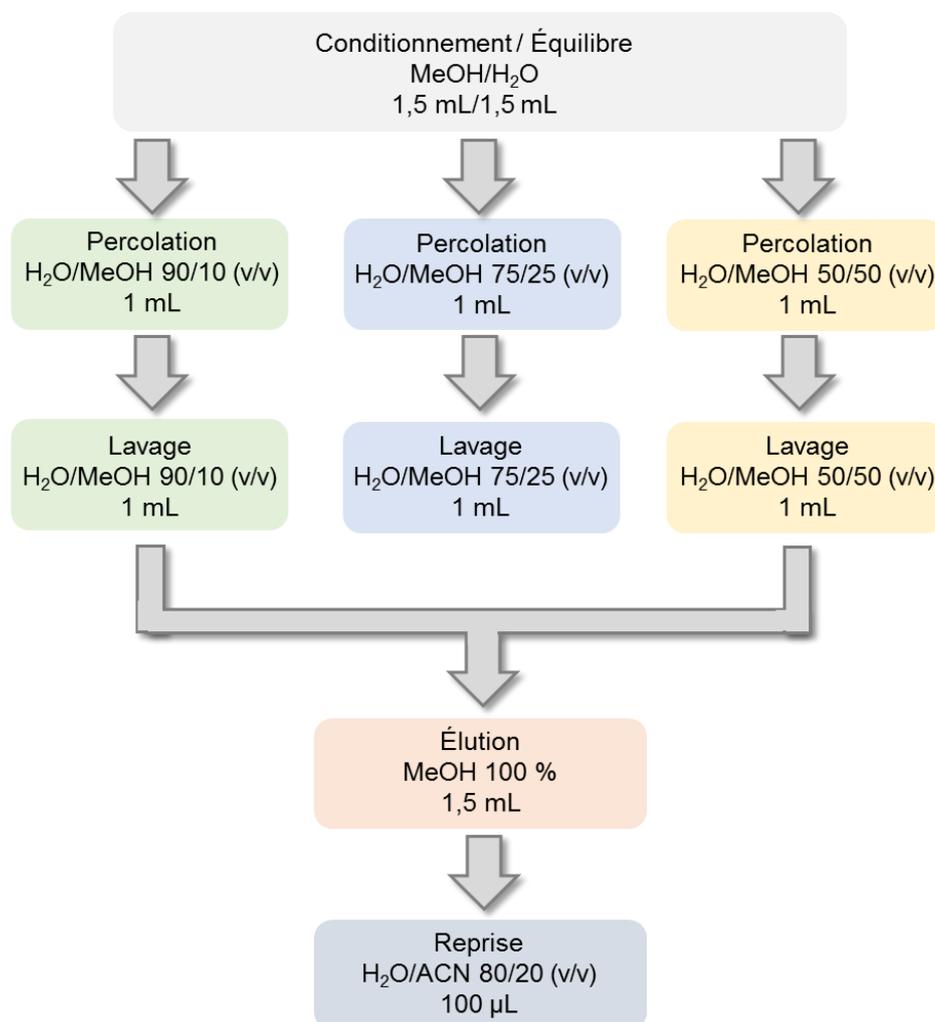


Figure 76 : Différentes conditions testées pour la percolation et le lavage du mélange standard d'eicosanoïdes sur le support Oasis® HLB

### 3. Effet matrice

Un éventuel effet matrice lorsque l'extraction du mélange d'eicosanoïdes standards, aux concentrations 15, 60 et 100 nmol.L<sup>-1</sup> est effectuée à partir de culots cellulaires broyés et repris dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v), a été évalué. Une quantité identique du mélange d'étalons internes (EI) a été ajoutée pour les trois concentrations d'eicosanoïdes testées et le ratio entre l'étalon interne représentatif d'une famille d'eicosanoïdes et chaque eicosanoïde correspondant dans le mélange a été calculé (EI/Eico).

#### 4. Validation de la méthode

La répétabilité, la reproductibilité, la linéarité, la LOD et la LOQ ont été évaluées par la suite. Comme précédemment décrit, la répétabilité et la reproductibilité ont été déterminées par le calcul du CV des ratios EI/Eico calculés à partir des aires des pics chromatographiques. Ces critères sont validés pour un CV inférieur à 15 %. La LOD et la LOQ ont été estimées pour un rapport S/N supérieur à 3 et 10, respectivement. Trois points de contrôle qualité ont été ajoutés afin de déterminer l'exactitude de la méthode.

#### B. Analyse des eicosanoïdes sur les culots cellulaires JEG-3

##### 1. Traitement des échantillons

L'analyse des eicosanoïdes a été réalisée sur 15 culots de cellules JEG-3 incubées en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et 15 culots contrôles, correspondant à des cellules JEG-3 incubées en présence de DMSO. Les culots cellulaires secs ont été repris dans 1 mL d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) puis broyés mécaniquement à l'aide d'un broyeur automatique Precellys® 24-Dual (Precellys, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). Après centrifugation 10 min à 2 000 rpm, les surnageants ont été récupérés et additionnés de 1 % d'AF en volume. Une partie du surnageant (20  $\mu\text{L}$ ) a été prélevée afin d'effectuer le dosage de protéines, le reste a été utilisé pour extraire les eicosanoïdes suivant les étapes brièvement indiquées ci-dessous :

- conditionnement : 1,5 mL MeOH puis 1,5 mL H<sub>2</sub>O ;
- percolation : 1 mL d'échantillons dans H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) + 1 % AF ;
- lavage : 1 mL H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) ;
- élution : 1,5 mL MeOH + 1 % NH<sub>4</sub>OH (v/v) ;
- reprise : 100  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O/ACN/IPr 60/20/20 (v/v/v).

Un mélange équimoléculaire de chaque échantillon a été prélevé afin de constituer un contrôle qualité (QC 1/1). Ce dernier a ensuite été dilué au tiers et au sixième pour obtenir deux autres contrôles qualité, les QCs 1/3 et 1/6 respectivement. Un blanc d'extraction, constitué du mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v), ainsi que le mélange d'eicosanoïdes standards ont subi les mêmes étapes de traitement que les échantillons. Le QC 1/1 a été utilisé pour conditionner la colonne chromatographique et a ensuite, comme les QCs 1/3 et 1/6, été injecté régulièrement au cours de l'analyse des échantillons.

## 2. Analyse UPLC-MS

Les échantillons ont été analysés par UPLC-MS selon la méthode développée précédemment. La séparation des eicosanoïdes a été réalisée sur une colonne BEH™ C<sub>18</sub> (2,1 µm x 100 mm, 1,7 µm) équipée d'une précolonne BEH™ C<sub>18</sub>. Un mélange H<sub>2</sub>O/ACN 70/30 (v/v) contenant 0,1 % d'acide acétique a été utilisé pour constituer la phase A et un mélange ACN/IPr 50/50 (v/v) contenant 0,02 % d'acide acétique pour composer la phase B. En MS, l'ionisation des eicosanoïdes est obtenue par électronébulisation en mode négatif (ESI-).

## 3. Prétraitement des données

La conversion des fichiers, le prétraitement des données et les normalisations ont été effectuées comme décrit précédemment (*cf* Analyse lipidomique globale dans les cellules JEG-3).

## 4. Analyses statistiques multivariées

Une première étape a porté sur la réalisation d'une analyse statistique non supervisée, de type PCA, afin d'observer la direction naturelle de plus grande variation entre les échantillons. Cette première étape a été suivie d'analyses supervisées de type PLS-DA et OPLS-DA conduisant à la création de nouveaux modèles. Ces derniers ont permis de rechercher les variables discriminantes, responsables de la séparation des groupes. La validation du modèle créé par PLS-DA a été effectuée par un test de permutation à 999 itérations et un test CV-ANOVA. Le modèle généré par OPLS-DA a été validé par un test CV-ANOVA. Les variables ont été considérées discriminantes seulement si le  $|p(\text{corr})|$  et le score VIP qui leurs sont associés sont respectivement égaux ou supérieurs à 0,5 et 1. Un test univarié (Wilcoxon) suivie d'une correction FDR des *p-values* a ensuite été réalisé sur l'ensemble des variables discriminantes retenues afin de vérifier que l'intensité de chacune d'elles est significativement différente entre les deux groupes d'échantillons.

## 5. Annotation des variables

À l'issue des analyses statistiques, les variables ont été annotées à l'aide de la base de données METLIN. Une tolérance de 5 ppm a été appliquée sur les valeurs de *m/z* des variables. Une relation linéaire entre le temps de rétention des molécules et leur logP a pu être établie afin de confirmer l'annotation des variables. Une erreur de 15 % a été acceptée sur les temps de rétention.

### III. Résultats

#### A. Mise au point de la méthode d'analyse

##### 1. Analyse UPLC-MS

La famille des eicosanoïdes regroupe des composés isomères de positions et isobares, rendant leur analyse difficile. En effet, la sous-classe des HETEs regroupe plus de 10 molécules isomères selon la position du groupement hydroxyle sur la chaîne carbonée. De même, les EETs et les DHETs sont constitués de plusieurs isomères de position. Généralement, des spectromètres de masse de type triple quadripôles sont utilisés pour l'analyse des eicosanoïdes car ils permettent le suivi de transitions spécifiques à chaque isomère en mode MRM<sup>368,369</sup>. Ainsi, des molécules de même  $m/z$  et peu séparées en chromatographie peuvent tout de même être identifiées. L'usage d'un spectromètre de type Q-TOF, ne permettant pas le suivi des transitions, rend plus difficile l'identification de molécules isobares. Il est alors nécessaire que la méthode chromatographique en amont permette la meilleure séparation possible des molécules afin de faciliter leur analyse.

De ce fait, la température de colonne, le débit de phase mobile et le gradient d'élution ont été ajustés pour obtenir une bonne séparation des 25 eicosanoïdes étudiés. La méthode d'analyse étant destinée à rechercher les eicosanoïdes présents à un niveau basal dans des culots cellulaires, un compromis entre résolution, sensibilité et temps d'analyse a dû être établi lors de la mise au point. Afin d'optimiser la sensibilité de la détection en spectrométrie de masse, un plan d'expérience a été réalisé sur quatre paramètres : tension du capillaire, tension du cône d'échantillonnage, température de la source d'ionisation et température de désolvatation. Enfin, l'étape d'extraction par SPE a été mise au point afin d'obtenir des rendements maximum pour chaque molécule. La méthode d'analyse a ensuite été validée par l'évaluation de l'effet matrice, répétabilité, reproductibilité, linéarité, exactitude, LOD et LOQ.

##### 1.1. Ajustement des paramètres chromatographiques

Dans un premier temps, le mélange d'eicosanoïdes standard à la concentration individuelle de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , a été analysé dans les conditions initiales suivantes :

- débit de phase mobile :  $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$  ;
- température de colonne :  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  ;
- temps d'analyse : 6,5 min.

Le gradient chromatographique a été adapté de la littérature<sup>242</sup> et est décrit ci-dessous (Figure 77) :

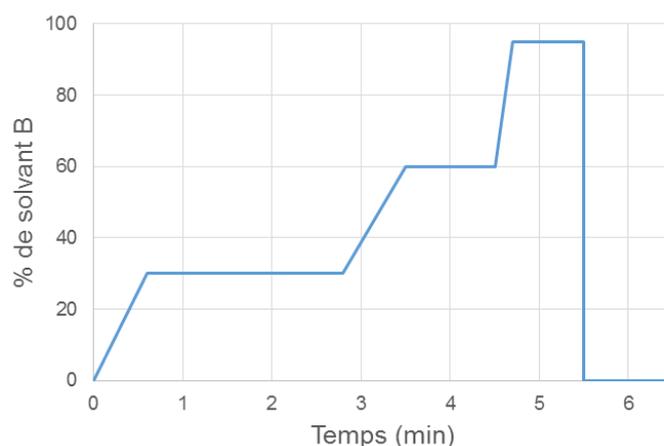


Figure 77 : Gradient chromatographique pour l'analyse initiale du mélange d'eicosanoïdes standards par UPLC-MS  
 Solvant A : H<sub>2</sub>O/ACN 70/30 (v/v) + 0,1 % acide acétique, solvant B: ACN/IPr 50/50 (v/v) + 0,02 % acide acétique

Le chromatogramme obtenu dans ces conditions montre une séparation incomplète des eicosanoïdes du mélange, notamment pour les sous-classes des PGs, des HETEs, des DHETs et des EETs (Figure 78).

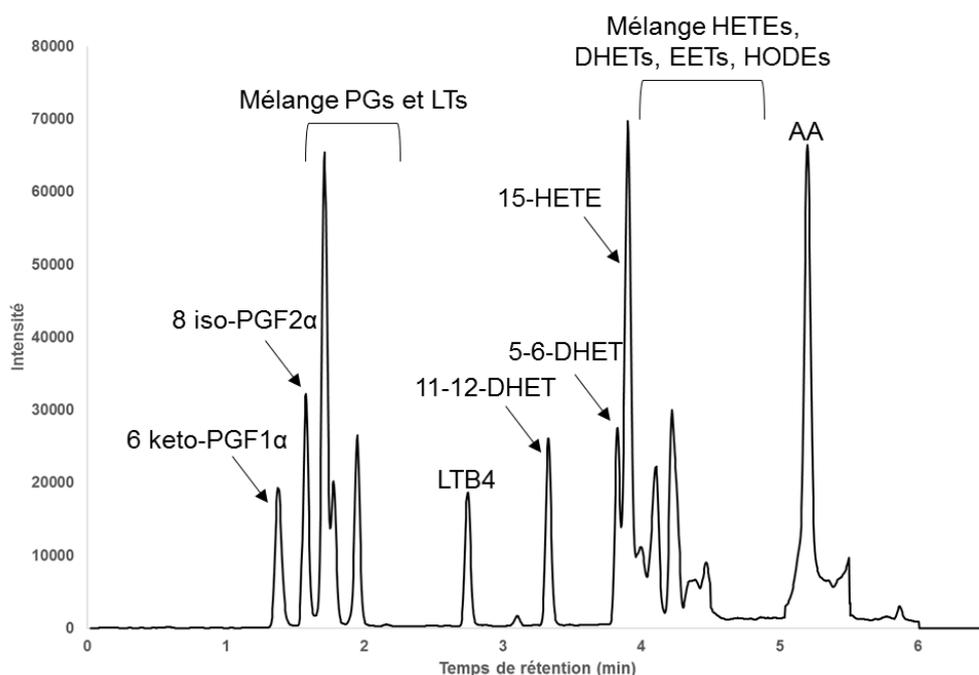


Figure 78 : Chromatogramme obtenu dans les conditions initiales décrites

Dans les mêmes conditions de gradient chromatographique, la température de colonne ainsi que le débit de phase mobile ont été ajustés afin d'améliorer la séparation. Pour ce faire, le paramètre de résolution entre les pics chromatographiques du 5-6-DHET et du 15-HETE a

été calculé pour chaque condition et l'intensité des pics a été relevée. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 79, Figure 80) :

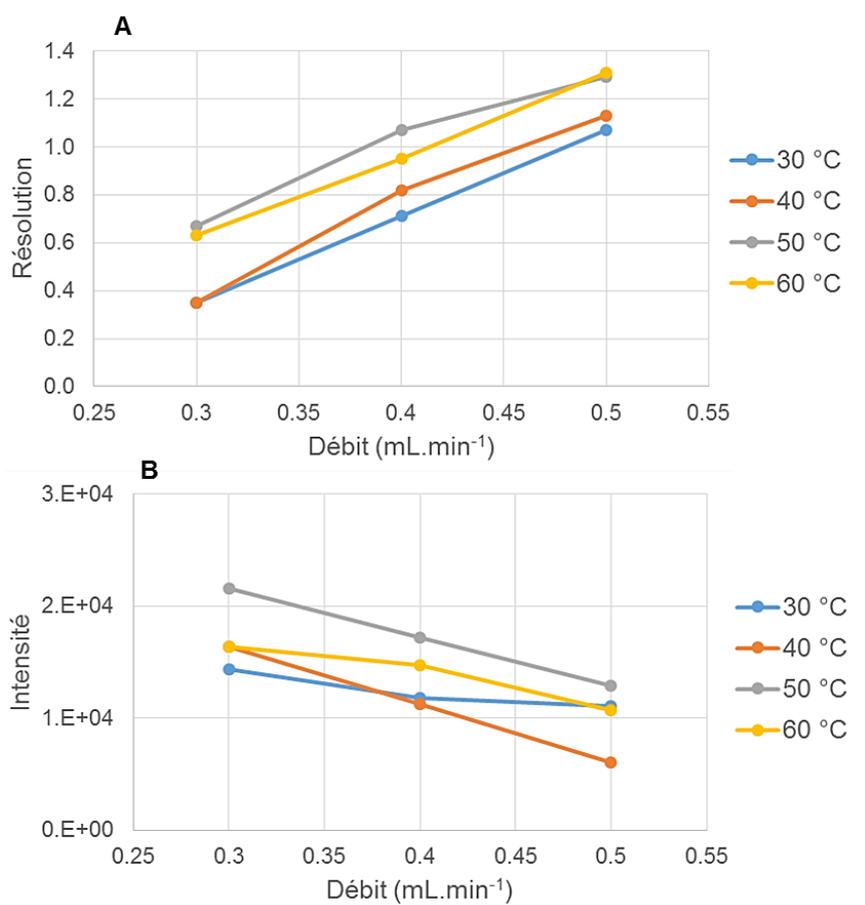


Figure 79 : Résolution (A) et intensité (B) en fonction du débit de phase mobile à température de colonne constante

A : résolution calculée entre les pics 5-6-DHET et 15-HETE

B : intensité relevée pour le pic du 5-6-DHET

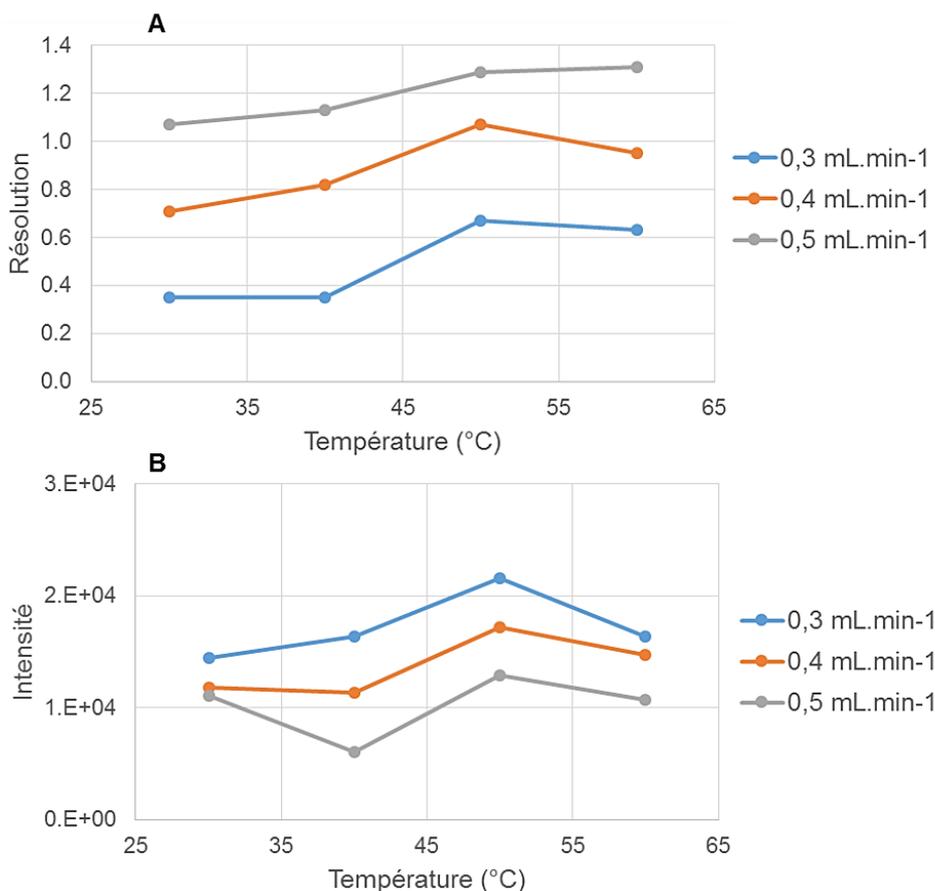


Figure 80 : Résolution (A) et intensité (B) en fonction de la température de colonne, à débit de phase mobile constant

A : résolution calculée entre les pics 5-6-DHET et 15-HETE

B : intensité relevée pour le pic du 5-6-DHET

La résolution entre les pics a été calculée selon la formule (Équation 2) :

$$R_{1/2} = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_2 + \omega_1} \right)$$

Équation 2 : Formule de la résolution entre deux pics chromatographiques

$t_{R1}$  : temps de rétention du pic 1,  $t_{R2}$  : temps de rétention du pic 2,  $\omega_1$  : largeur à la base du pic 1,  $\omega_2$  : largeur à la base du pic 2

D'après les résultats, pour une température donnée, la résolution croît avec le débit alors que l'intensité des pics diminue. Par ailleurs, pour un débit maintenu constant, la résolution croît avec la température de colonne alors que l'intensité diminue. Cependant, l'effet du débit sur la résolution est beaucoup plus marqué que l'effet de la température. De plus, quelles que soient les conditions, l'effet sur l'intensité des pics reste relativement faible, variant au plus du simple au double. En revanche, l'effet sur la résolution est très marqué puisque celle-ci varie entre 0,35 et 1,41 selon les conditions. De fait, les paramètres les plus adaptés en termes de résolution et d'intensité semblent être, pour la colonne, une température de 50 °C et pour la

phase mobile un débit de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ces paramètres ont donc été utilisés pour le reste de l'étude.

Différents gradients d'élution ont été testés afin d'améliorer la séparation des PGs en début d'analyse et des HETEs et EETs à la fin. Le temps d'analyse a été allongé de 6,5 min à 9, 12, 15, 20 et 30 min. Un mélange d'eicosanoïdes composé uniquement des sous-classes HETEs et EETs (dix molécules) a été injecté et les plateaux d'élution aux rapports de solvants A/B suivants ont été testés : 40/60, 50/50, 55/45 et 65/35 (v/v) (Figure 81).

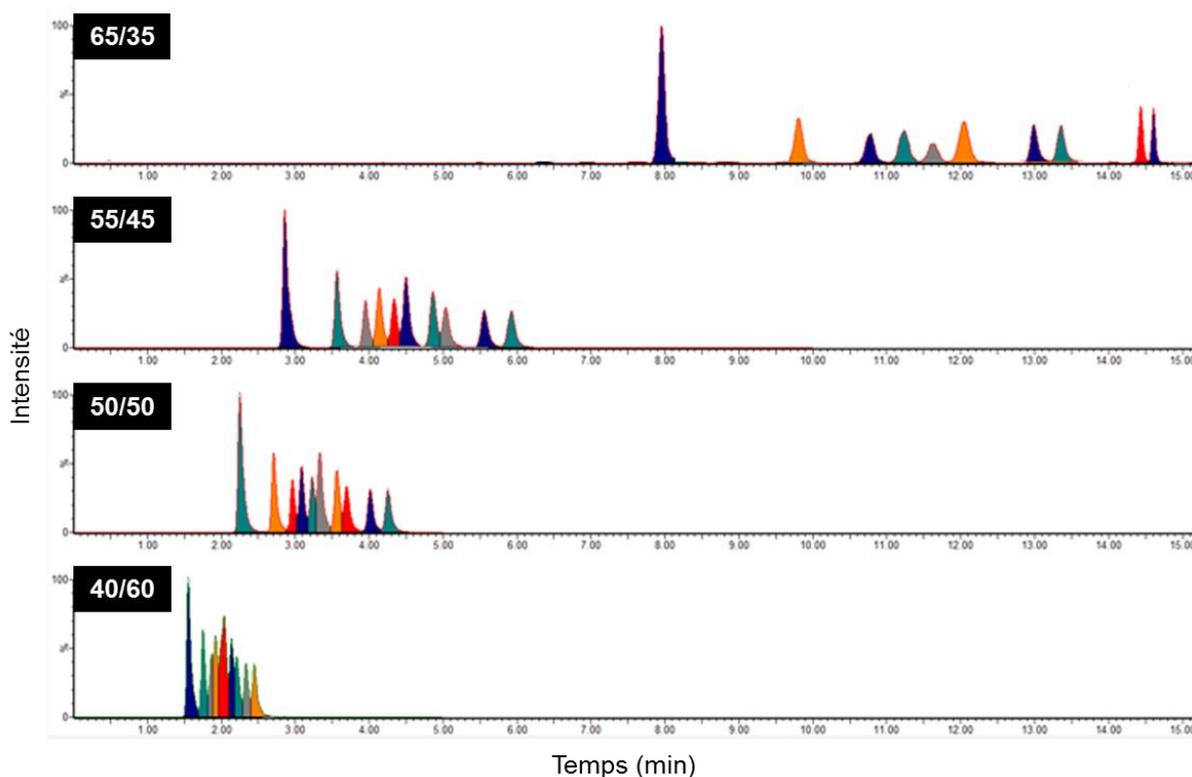


Figure 81 : Séparation d'un mélange des sous-classes HETEs et EETs selon quatre plateaux d'élution différents

Les résultats montrent une nette amélioration de la séparation quand le rapport solvants A/B augmente. La meilleure séparation des dix eicosanoïdes est ainsi obtenue pour un mélange de solvants A/B égal à 65/35 (v/v). Cette amélioration intervient au détriment de la durée d'analyse. La méthode chromatographique finalement retenue utilise un gradient présenté en Figure 82, la durée d'une analyse étant alors de 20 min.

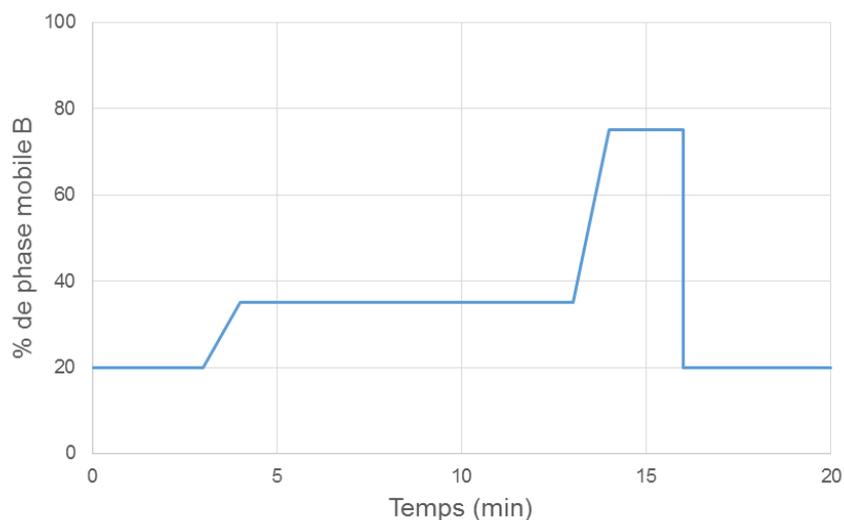


Figure 82 : Gradient chromatographique final pour l'analyse du mélange d'eicosanoïdes final

L'analyse débute avec une phase mobile contenant 20 % de solvant B. Cette condition est maintenue pendant 3 min, puis la proportion de B augmente à 35 % en 1 min et reste stable à cette valeur pendant 9 min. La proportion de B augmente à nouveau jusqu'à 75 % en 1 min et est maintenue durant 2 min avant de revenir rapidement à sa valeur initiale pour s'y maintenir 4 min. Dans ces conditions la séparation du mélange d'eicosanoïdes standards est la suivante (Figure 83) :

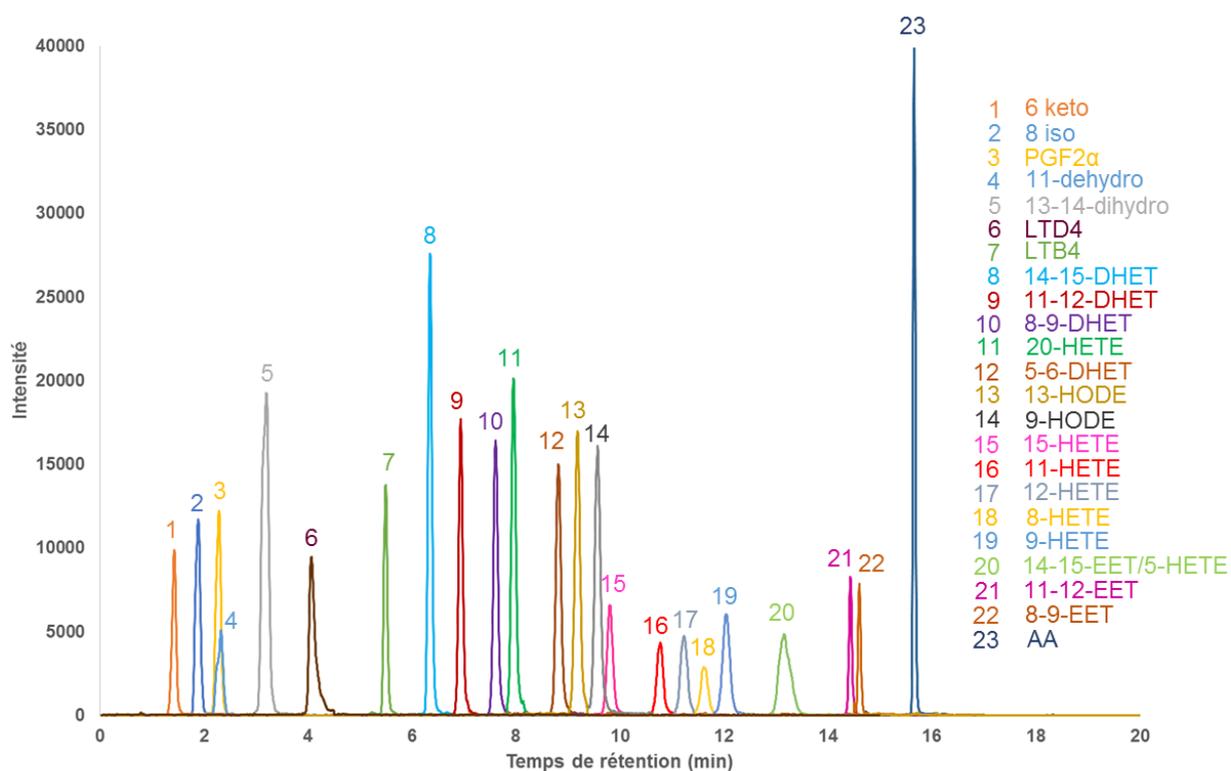


Figure 83 : Séparation chromatographique du mélange d'eicosanoïdes standards dans les conditions finales  
 6-keto : 6-keto-PGF1 $\alpha$ , 8-iso : 8-iso-PGF2 $\alpha$ , 11-dehydro: 11-dehydro-TXB2,  
 13-14-dihydro : 13-14-dihydro-15-kéto-PGF2 $\alpha$ , AA : acide arachidonique

Le chromatogramme montre que la séparation presque complète de l'ensemble des eicosanoïdes du mélange est obtenue avec une durée raisonnable de 20 min. Comparé au chromatogramme obtenu dans les conditions initiales (Figure 78), une nette amélioration de la résolution a été obtenue. Bien qu'ils soient coélus, les eicosanoïdes PGF2 $\alpha$  et 11-dehydro-TXB2 (pics 3 et 4) peuvent être distingués l'un de l'autre puisqu'ils diffèrent par la valeur de  $m/z$ . En revanche, les composés 14-15-EET et 5-HETE (pic 20), qui présentent à la fois les mêmes valeurs de  $t_R$  et  $m/z$ , ne peuvent être formellement distingués en MS sans une étape de fragmentation.

L'ajustement de la température de colonne, du débit de phase mobile et du gradient d'élution a donc permis la mise au point d'une méthode chromatographique permettant la séparation de 23 des 25 eicosanoïdes présents dans le mélange de standards. Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode de dosage, certains paramètres de spectrométrie de masse ont été optimisés.

## 1.2. Optimisation des paramètres MS

L'optimisation des paramètres de tensions du capillaire et du cône d'échantillonnage ainsi que de températures de source d'ionisation et de désolvatation a été réalisée à partir d'une solution d'acide arachidonique à la concentration de 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Au total 30 essais divisés en trois blocs indépendants ont été effectués. L'aire sous le pic chromatographique de l'acide arachidonique a été utilisée comme paramètre de réponse (Tableau 24).

Tableau 24 : Aire du pic chromatographique de l'acide arachidonique selon les valeurs des paramètres A, B, C et D dans le plan composite centré

Essais	Bloc	A (kV)	B (V)	C (°C)	D (°C)	Réponse
1	1	3,00	32	110	300	19965
2	1	2,50	35	120	400	39381
3	1	3,00	32	130	500	41879
4	1	3,00	40	110	500	51150
5	1	3,00	40	130	300	31487
6	1	2,25	40	130	500	50128
7	1	2,50	35	120	400	39369
8	1	2,25	40	110	300	29044
9	1	2,25	32	110	500	39337
10	1	2,25	32	130	300	23741
11	2	2,25	32	110	300	22278
12	2	3,00	32	110	500	42073
13	2	3,00	40	110	300	32441
14	2	2,25	40	110	500	55741
15	2	2,25	32	130	500	42100
16	2	2,50	35	120	400	40596
17	2	3,00	32	130	300	26620
18	2	2,50	35	120	400	40789
19	2	3,00	40	130	500	52777
20	2	2,25	40	130	300	35032
21	3	2,50	35	120	200	17712
22	3	2,50	35	120	600	54771
23	3	2,50	35	150	400	39512
24	3	2,00	35	120	400	39902
25	3	2,50	45	120	400	45550
26	3	2,50	30	120	400	30902
27	3	2,50	35	120	400	40129
28	3	3,50	35	120	400	43403
29	3	2,50	35	100	400	38564
30	3	2,50	35	120	400	39133

A : tension du capillaire, B : tension du cône d'échantillonnage, C : température de la source d'ionisation,  
D : température de désolvatation

D'après les résultats, l'aire sous la courbe du pic correspondant à l'acide arachidonique est augmentée de 17 000 à 55 000 selon la combinaison des valeurs des paramètres. Afin de déterminer les paramètres les plus influents sur la réponse et d'obtenir la combinaison optimale des quatre paramètres testés, l'effet de chacun d'eux a été calculé ainsi que les interactions de premier ordre entre les paramètres et les termes carrés. Les interactions de premiers ordres permettent de déterminer si les paramètres sont ou non dépendants les uns

des autres tandis que les termes carrés permettent de déterminer si la réponse d'un paramètre est linéaire.

Le logiciel JMP procède en trois étapes principales : détermination des paramètres significatifs, validation du modèle puis estimation des valeurs optimales.

La significativité des paramètres testés, des interactions de premier ordre et des termes carrés est décrite dans le résumé des effets et classée par ordre croissant de *p-values* (Tableau 25). Un histogramme des  $-\log_{10}(p\text{-value})$  est également représenté. Pour un risque  $\alpha$  à 1 %, une valeur supérieure ou égale à 2 sur cet histogramme est considérée significative puisque  $-\log_{10}(0,01) = 2$ .

Tableau 25 : Résumé des effets des différents paramètres, des interactions de premier ordre et des termes carrés

Résumé des effets		
Source	$-\log_{10}(p\text{-value})$	<i>p-value</i>
Température désolvation	14,449	0,00000
Tension cône échantillonnage	10,383	0,00000
Tension cône échantillonnage x Tension cône échantillonnage	5,129	0,00001
Température désolvation x Température désolvation	4,181	0,00007
Température source x Température désolvation	2,185	0,00654
Température source	1,898	0,01265
Température source x Température source	1,847	0,01422
Tension cône échantillonnage x Température désolvation	1,245	0,05683
Tension cône échantillonnage x Température source	1,240	0,05758
Tension capillaire x Tension cône échantillonnage	0,730	0,18628
Tension capillaire	0,402	0,39612
Tension capillaire x Température source	0,294	0,50862
Tension capillaire x Tension capillaire	0,251	0,56109
Tension capillaire x Température désolvation	0,047	0,89792

D'après les résultats deux des quatre paramètres testés et plusieurs facteurs impliquant les quatre paramètres sont significatifs : la température de désolvation, la tension du cône d'échantillonnage, le terme carré de la tension du cône d'échantillonnage, le terme carré de la température de désolvation, l'interaction de premier ordre entre la température de source et la température de désolvation et, dans une moindre mesure, la température de source et le terme carré de la température de source. Parmi les quatre paramètres du spectromètre de masse dont l'influence sur la sensibilité de la détection de l'acide arachidonique a été évaluée, la température de désolvation et la tension du cône d'échantillonnage sont les plus influents. Il est à noter que la réponse de ces deux paramètres n'est pas linéaire puisque les termes carrés sont significatifs. De fait, l'estimation des valeurs optimales de ces paramètres ne peut être appréhendée que par la réalisation d'un plan d'optimisation. Cependant, la robustesse du modèle généré doit être validée en amont du plan d'optimisation.

À cette fin, le modèle statistique généré a été évalué. Le graphique évaluant le lien entre les valeurs observées et les valeurs prédictives montre une forte corrélation ( $R^2$  à 0,99), démontrant la qualité du modèle statistique construit (Figure 84).

Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues

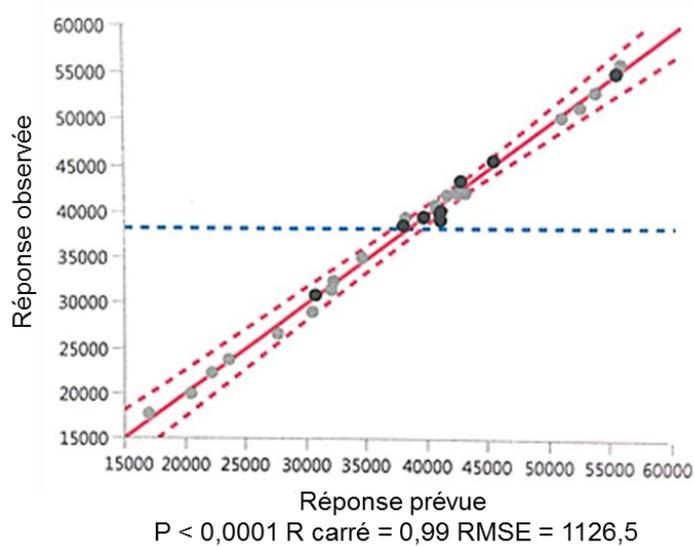


Figure 84 : Valeurs observées en fonction des valeurs prédictives

L'analyse de la variance ANOVA montre une valeur du test de Fischer (rapport F) élevée et une  $p$ -value (Prob. > F) faible ce qui confirme le résultat précédent (Tableau 26). L'hypothèse nulle du test de Fischer considère que le modèle généré observé ne diffère pas d'un modèle où toutes les valeurs prédites correspondent à la moyenne des aires mesurées. Ainsi, si la  $p$ -value est inférieure au risque  $\alpha$  de 1 %, l'hypothèse nulle est rejetée ce qui signifie qu'il existe au moins un effet significatif dans le modèle. Ici, la  $p$ -value étant inférieure à 1 %, il existe effectivement au moins un effet significatif des paramètres testés sur la réponse. Le test de défaut d'ajustement est un test de non-linéarité et évalue si le modèle décrit correctement les données. Le principe d'un tel test consiste à comparer deux variances : celle de l'erreur pure (source d'erreur expérimentale) et celle des déviations des données à la droite ajustée. L'erreur pure peut être réduite en augmentant la précision de la technique analytique tandis que le défaut d'ajustement dépend de la qualité du modèle de régression. De fait, le rapport F teste l'hypothèse nulle selon laquelle les deux variances sont égales, traduisant une absence de défaut d'ajustement. Si la  $p$ -value associée à ce test est inférieure au risque  $\alpha$  de 1 %, l'hypothèse nulle est rejetée traduisant ainsi un défaut d'ajustement significatif. Dans notre cas, la  $p$ -value est supérieure au risque  $\alpha$ , l'hypothèse nulle est validée ; il n'y a pas de défaut d'ajustement. Le modèle linéaire généré est donc le meilleur pour représenter les données.

Tableau 26 : Résultats de l'analyse de la variance ANOVA et du défaut d'ajustement

Résumé de l'ajustement						
R carré		0,99417				
R carré ajusté		0,986994				
Racine de l'erreur quadratique moyenne		1126,547				
Moyenne de la réponse		38183,53				
Observations		30				
Analyse de la variance						
Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob. > F	
Modèle	16	2813228038	175826752	138,5437	<0,0001*	
Résidus	13	16498391,3	1269107			
Total	29	28297226429				
Défaut d'ajustement						
Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob. > F	R carré max
Défaut d'ajustement	10	15983687	1598369	9,3162	0,0461	0,9998
Erreur pure	3	514705	171568			
Erreur totale	13	16498391				

À côté de l'importance jouée par les paramètres indiqués plus haut, le modèle construit montre que la température de la source d'ionisation et celle de désolvatation dépendent l'une de l'autre puisque leur interaction de premier ordre est significative. Cette interaction doit donc être prise en compte afin d'estimer les valeurs optimales des paramètres. De même la réponse des paramètres n'est pas linéaire, comme le montre la significativité des termes carrés. Un plan d'optimisation a donc été réalisé afin de déterminer les valeurs des différents paramètres permettant d'obtenir la réponse optimale, *i.e.* l'aire maximale sous le pic chromatographique de l'acide arachidonique. Le logiciel JMP utilise une fonction de désirabilité afin d'estimer ces valeurs. À l'issue de l'optimisation, les valeurs proposées sont :

- tension du capillaire : 2 kV ;
- tension du cône d'échantillonnage : 45 V ;
- température de la source d'ionisation : 100 °C ;
- température de désolvatation : 600 °C.

La réponse prédite pour ses valeurs est une aire de 66 923. Afin de vérifier que les valeurs estimées mènent bien à la réponse optimale, cinq injections répétées d'acide arachidonique ont été effectuées dans ces conditions. La réponse moyenne obtenue est de  $66\,260 \pm 1,2\%$ . Les valeurs prédites par le logiciel, suite à l'optimisation, conduisent bien à une réponse expérimentale maximale et ont donc été conservées pour le reste de l'étude.

## 2. Extraction sur phase solide

L'extraction des eicosanoïdes par SPE a été mise au point sur des supports Oasis® HLB (1 cc, 30 mg, 30 µm). Dans un premier temps, les conditions de percolation et de lavage ont été testées en utilisant comme solvant un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH en différentes proportions (Figure 85).

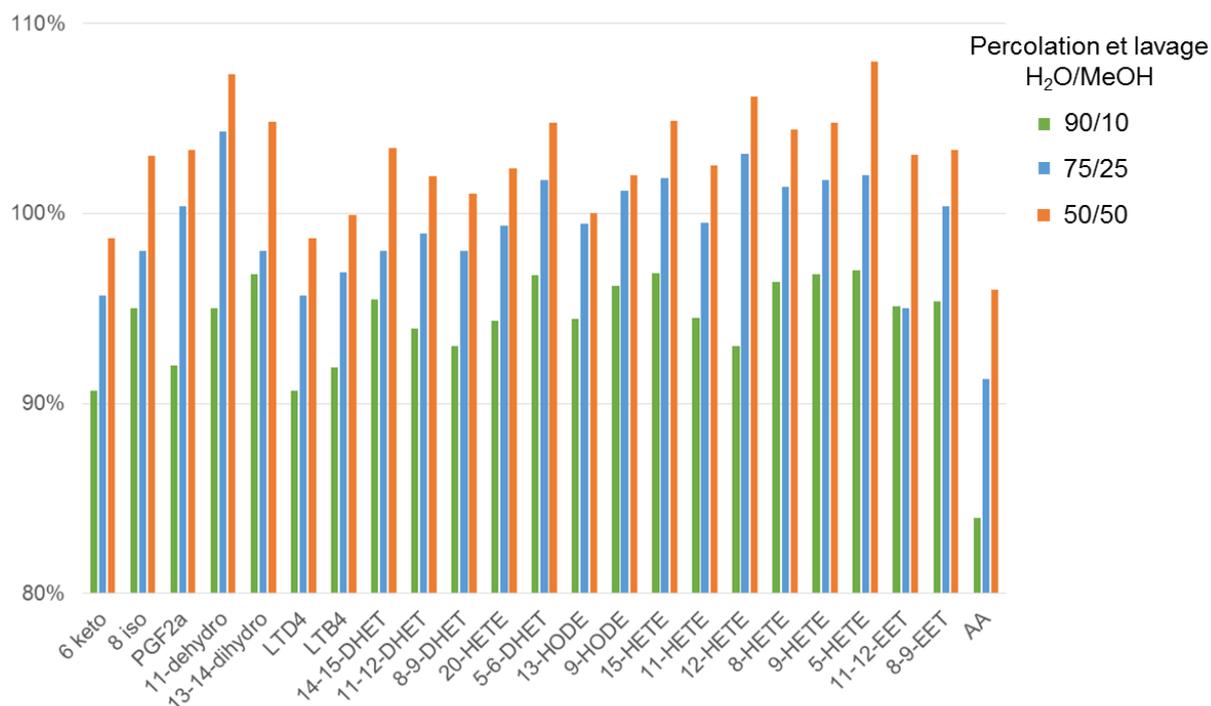


Figure 85 : Rendements à l'élution selon différentes conditions de percolation et de lavage (n = 1) 90/10, 75/25, 50/50 : percolation et lavage dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 90/10, 75/25 ou 50/50 v/v, respectivement

Les résultats indiquent une amélioration modérée du rendement d'extraction lorsque la proportion du mélange H<sub>2</sub>O/MeOH est de 50/50 (v/v). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la reprise des eicosanoïdes dans un mélange contenant une proportion d'eau supérieure à 50 % ne permet vraisemblablement de solubiliser qu'une partie des composés. En revanche, l'utilisation du mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) permet à la fois une reprise quantitative des eicosanoïdes tout en ne provoquant pas de perte lors de l'étape de lavage. Le mélange précédent a donc été retenu pour l'extraction des eicosanoïdes à partir des culots cellulaires.

L'influence sur le rendement d'extraction des eicosanoïdes consécutive à l'addition d'AF à 1 % (v/v) au mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) a, par la suite, été testée. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 86).

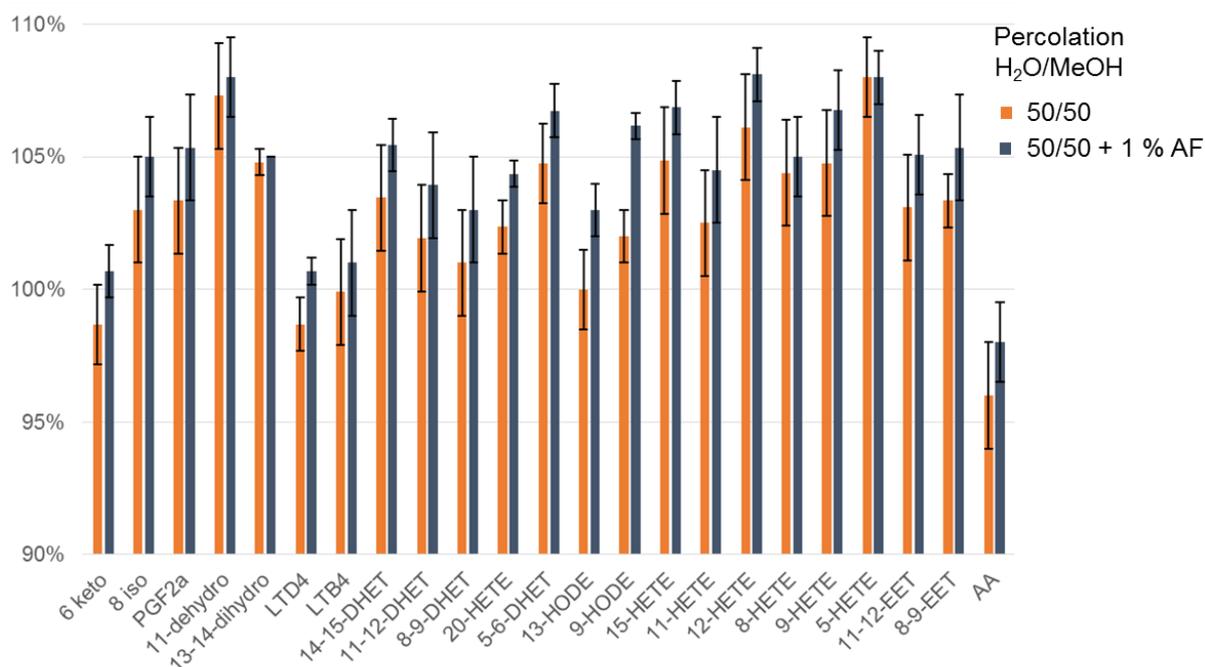


Figure 86 : Rendements à l'élution selon l'absence ou la présence d'acide formique à la solution de percolation (n = 3)

L'étape de lavage a été réalisée avec mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) dans les deux cas  
 L'étape d'élution a été effectuée avec du MeOH 100 % pour une percolation H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) et avec du MeOH + 1 % NH<sub>4</sub>OH (v/v) pour une percolation H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) + 1 % AF

L'ajout d'AF à la solution de percolation améliore légèrement les rendements d'extraction. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'en milieu acide, les eicosanoïdes sont majoritairement sous forme non ionisée, ce qui permet une rétention accrue sur les supports Oasis® HLB. L'étape d'élution en milieu alcalin par addition au MeOH de 1 % (v/v) d'hydroxyde d'ammonium permet le recueil quantitatif des eicosanoïdes déposés. Ces conditions ont donc été retenues pour le reste de l'étude.

Enfin, l'étape de reprise des échantillons avant injection en UPLC-MS a également été optimisée en termes de choix et proportion de solvants utilisés. Le volume de reprise a été fixé à 100 µL ce qui permet la pré concentration des eicosanoïdes par un facteur dix puisque le volume de percolation de l'échantillon est de 1 mL. Le mélange de solvants utilisé lors de la reprise doit permettre la resolubilisation quantitative de l'échantillon extrait et doit également être compatible avec la phase mobile et favoriser au mieux l'ionisation des eicosanoïdes en spectrométrie de masse. Les différents mélanges de solvants suivants ont été testés : H<sub>2</sub>O/ACN 80/20 (v/v), H<sub>2</sub>O/ACN/IPr 80/10/10 (v/v/v), H<sub>2</sub>O/ACN/IPr 70/20/10 (v/v/v) et H<sub>2</sub>O/ACN/IPr 60/20/20 (v/v/v). Les meilleurs rendements sont obtenus avec le mélange H<sub>2</sub>O/ACN/IPr 60/20/20 (v/v/v). L'ajout d'isopropanol favorise la solubilisation des eicosanoïdes tout en étant compatible avec les conditions d'analyse.

Les conditions finales d'extraction sont décrites ci-après :

- conditionnement : 1,5 mL MeOH puis 1,5 mL H<sub>2</sub>O ;
- percolation : 1 mL dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) + 1 % AF ;
- lavage : 1 mL H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) ;
- elution: 1,5 mL MeOH + 1 % NH<sub>4</sub>OH;
- évaporation et reprise 100 µL H<sub>2</sub>O/ACN/IPr 60/20/20 (v/v/v).

### 3. Effet matrice

L'effet matrice a été évalué à partir des culots cellulaires broyés en suspension dans le mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) surchargés en eicosanoïdes standards et extrait dans les conditions décrites ci-dessus. Trois surcharges en eicosanoïdes ont été testées : 15, 60 et 100 nmol.L<sup>-1</sup> en concentration finale. Une quantité fixe du mélange d'étalons internes (EI) a été ajoutée pour chaque point et le ratio entre l'étalon interne représentatif d'une famille d'eicosanoïdes et les eicosanoïdes correspondant a été calculé (EI/Eico). Les résultats pour six eicosanoïdes sont présentés ci-dessous et sont représentatifs de l'ensemble des eicosanoïdes standards du mélange (Figure 87).

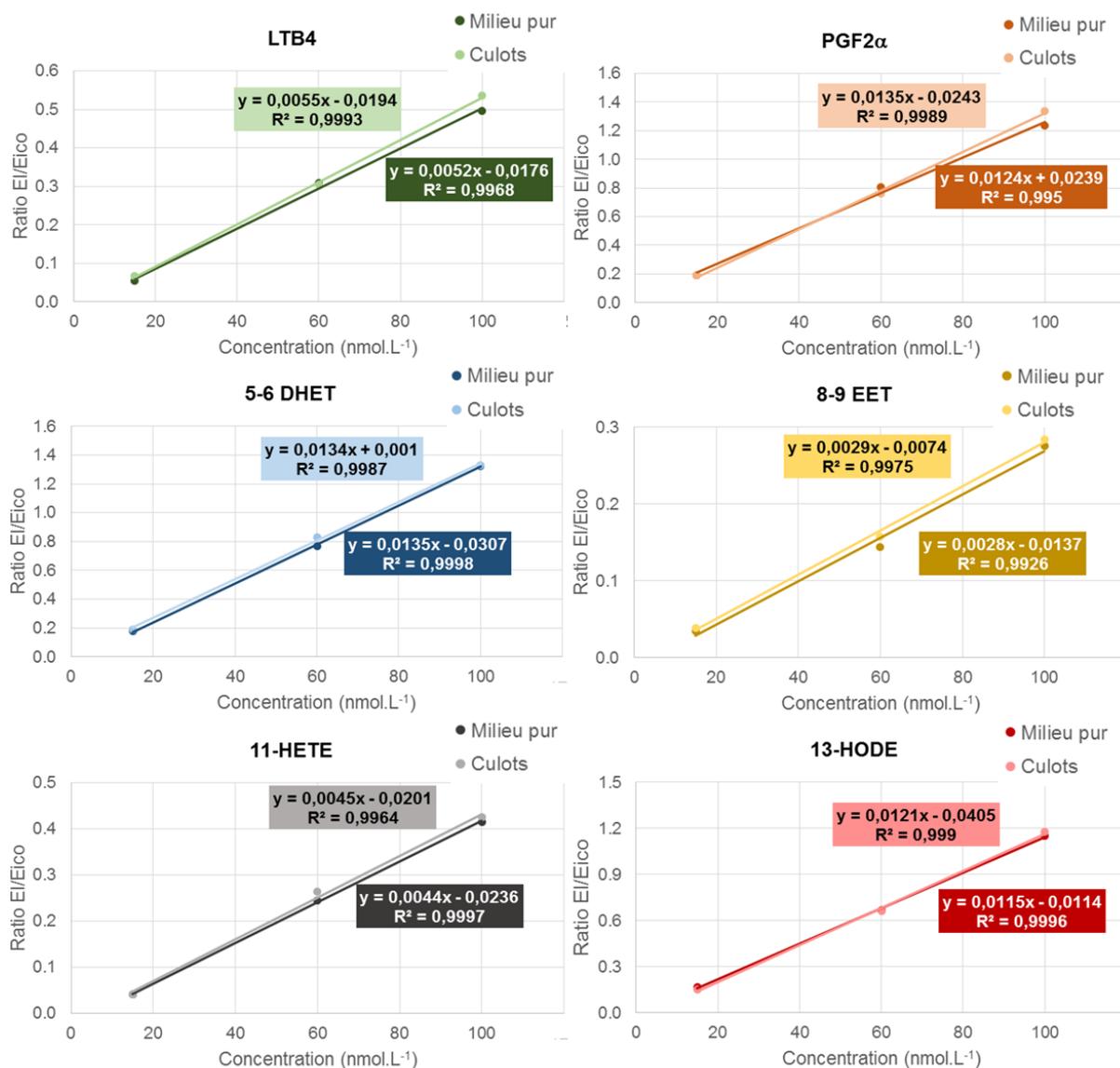


Figure 87 : Évaluation de l'effet matrice pour six eicosanoïdes, sur trois concentrations différentes : 15, 60 et 100 nmol.L<sup>-1</sup>

Milieu pur : mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v), Culots : culots cellulaires broyés et repris dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v)

Les résultats obtenus montrent l'absence d'effet matrice lié à la présence des culots cellulaires lors de l'analyse des eicosanoïdes. Par conséquent, la validation de la méthode a été effectuée dans le milieu H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v).

#### 4. Validation de la méthode

La LOD et la LOQ des eicosanoïdes du mélange de standards s'échelonnent respectivement de 1 à 5 nmol.L<sup>-1</sup> (1,4-12,4 pg injectés) et de 10 à 20 nmol.L<sup>-1</sup> (15-125 pg injectés). Les gammes de concentration ont donc été réalisées de 20 nmol.L<sup>-1</sup>, la LOQ la plus haute, à 200 nmol.L<sup>-1</sup>. La valeur haute de la gamme de concentration a été retenue car les

concentrations en eicosanoïdes attendues dans les culots cellulaires ne devraient pas excéder 200 nmol.L<sup>-1</sup>. La répétabilité (n = 3) et la reproductibilité (n = 3) ont été évaluées. Les résultats pour la répétabilité, obtenus à partir de six eicosanoïdes, sont présentés ci-dessous (Figure 88).

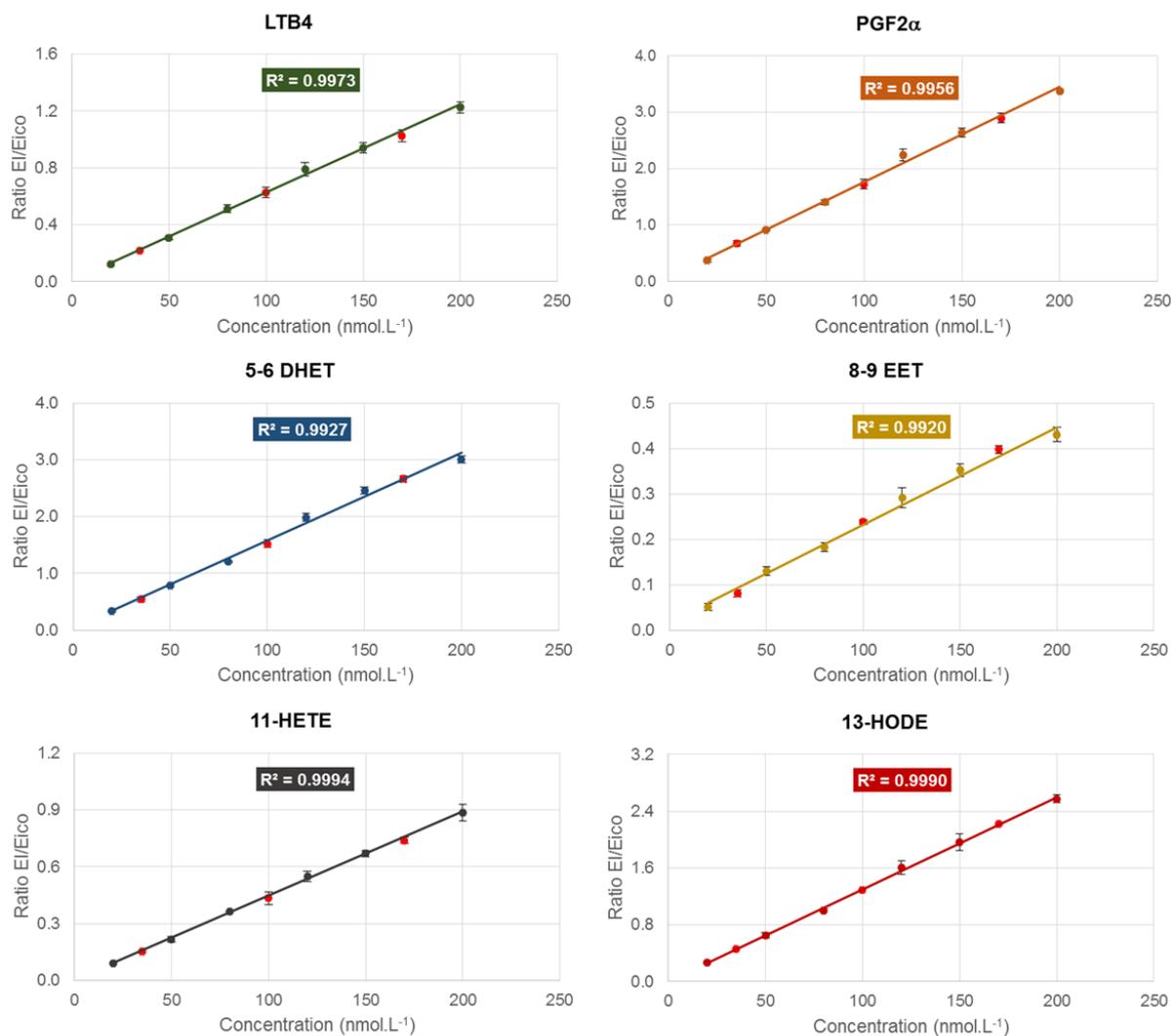


Figure 88 : Répétabilité de la méthode d'analyse des eicosanoïdes dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v), pour une gamme de 20 à 200 nmol.L<sup>-1</sup>  
Les points rouges correspondent aux trois points de contrôles qualité

Les CV calculés sont tous inférieurs à 10 % ; la méthode d'analyse proposée est donc répétable et reproductible. La valeur du R<sup>2</sup> montre que la méthode est linéaire sur la gamme de concentration testée. L'exactitude calculée à partir des contrôles qualité est de 98 %. La méthode mise au point est donc validée et peut être appliquée à l'analyse des eicosanoïdes dans des culots cellulaires.

## B. Analyse des eicosanoïdes dans les culots cellulaires JEG-3

Afin d'évaluer l'effet potentiel du MEHP sur le métabolisme placentaire des eicosanoïdes, une étude a été menée sur 15 culots cellulaires incubés en présence de MEHP et 15 culots contrôles. L'approche choisie s'apparente à une analyse lipidomique globale pour laquelle une attention particulière a été portée aux acides gras et notamment aux eicosanoïdes. Après extraction et analyse par SPE-UPLC-MS, les données ont été prétraitées à l'aide du logiciel XCMS. La matrice de données obtenue a été normalisée en vue d'effectuer les analyses statistiques.

### 1. Prétraitement des données

Une régression locale de type loess a été appliquée sur les données afin de corriger la fluctuation du signal observée au fil des injections du QC 1/1 (Figure 89).

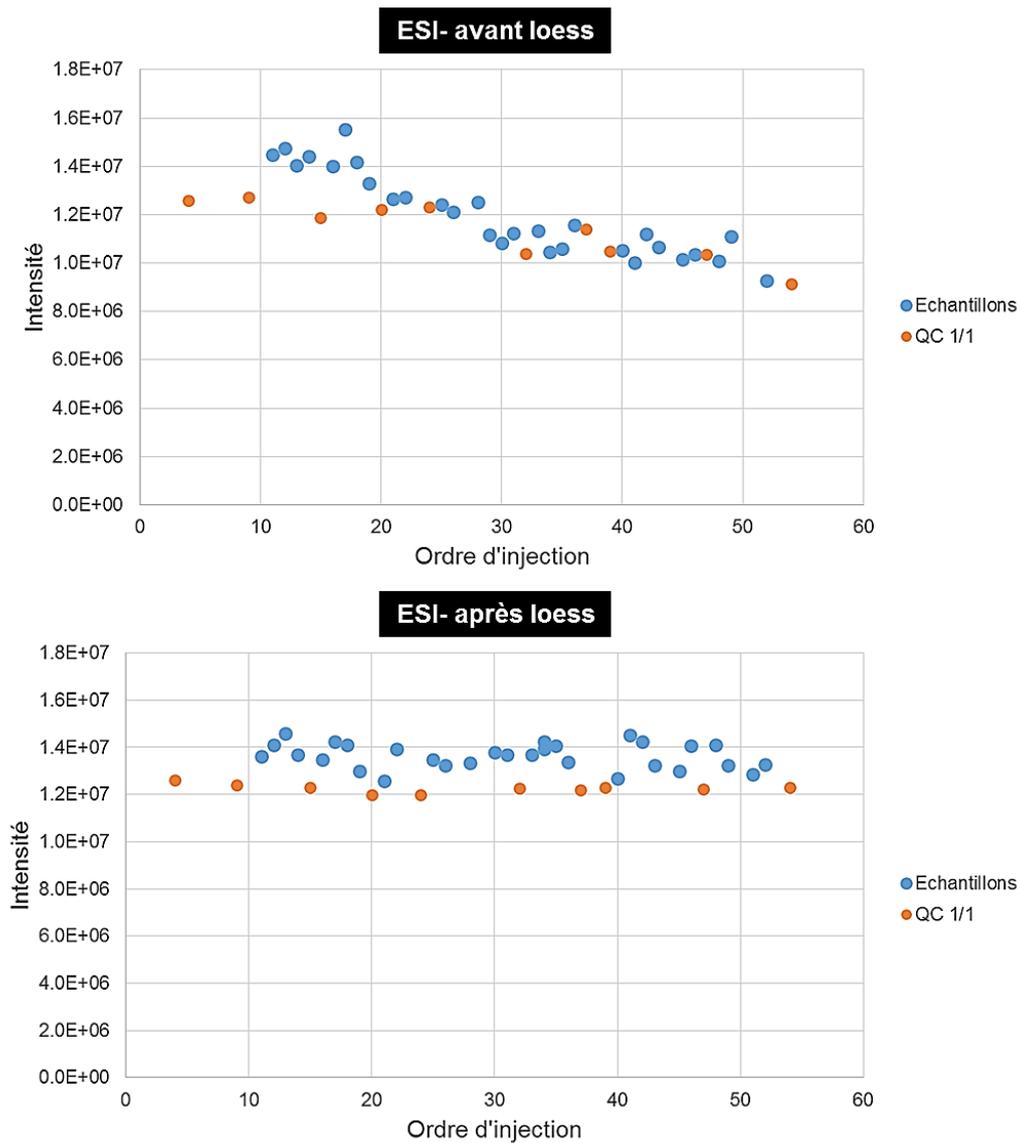


Figure 89 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection

## 2. Analyses statistiques multivariées

La représentation *score plot* du modèle construit en PCA permet de visualiser, de façon non supervisée, la répartition naturelle dans échantillons dans l'espace (Figure 90). Deux clusters distincts sont visibles et correspondent au groupe d'appartenance des échantillons. Les valeurs des paramètres  $R^2$  et  $Q^2$ , 0,72 et 0,54, respectivement, traduisent la forte capacité explicative et prédictive du modèle.

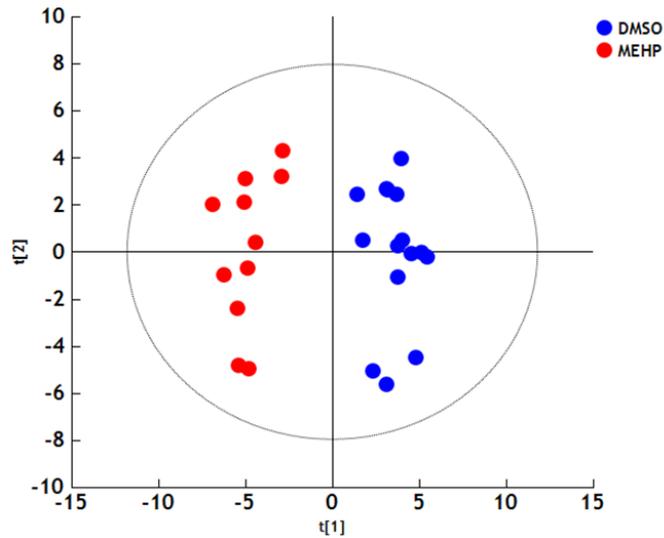


Figure 90 : *Score plot* du modèle généré en PCA

MEHP : groupe correspondant aux cellules incubées en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 72 h ( $< 0,1 \%$  v/v)

Afin de rechercher les variables discriminantes responsables de la séparation entre les deux groupes d'échantillons, deux nouveaux modèles ont été construits à l'aide d'analyses statistiques supervisées. Un modèle a été généré par PLS-DA et validé par un test de permutation et un test CV-ANOVA. Comme l'indique sa représentation *score plot*, le modèle confirme la séparation de groupe observée en PCA (Figure 91). Les paramètres du modèle indiquent que celui-ci utilise 45 % des variables ( $R^2X$ ) pour expliquer 97 % ( $R^2Y$ ) et prédire 93 % ( $Q^2$ ) de la variabilité. Le test de permutation et le test CV-ANOVA ( $p\text{-value} = 10^{-11}$ ) confirme la validité du modèle généré en PLS-DA.

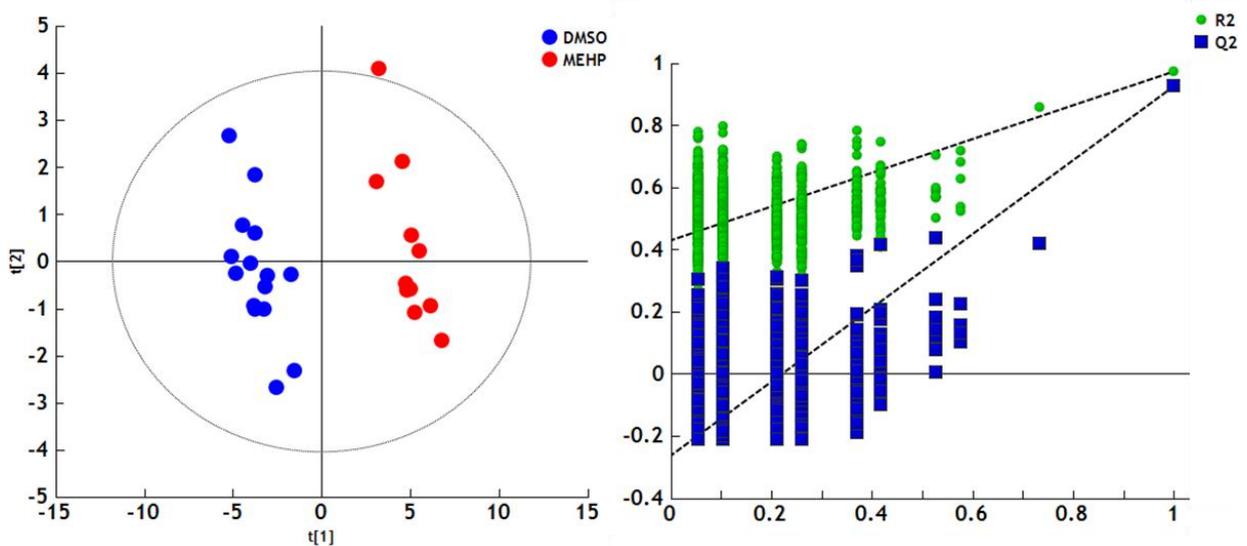


Figure 91 : *Score plot* et test de permutation (999 itérations) du modèle construit en PLS-DA

MEHP : groupe correspondant aux cellules incubées en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 72 h ( $< 0,1 \%$  v/v)

Un troisième modèle a enfin été construit par OPLS-DA. La représentation *score plot* de ce modèle, dont les performances ont été évaluées par un test CV-ANOVA ( $p\text{-value} = 10^{-12}$ ), confirme une nouvelle fois la séparation nette entre les deux groupes d'échantillons (Figure 92). Ce modèle utilise 46 % des variables pour expliquer 98 % et prédire 93 % de la variabilité ; ce qui traduit une très bonne capacité explicative et prédictive. Le modèle a finalement été représenté sous forme de *S-plot* afin de rechercher les variables discriminantes (Figure 92).

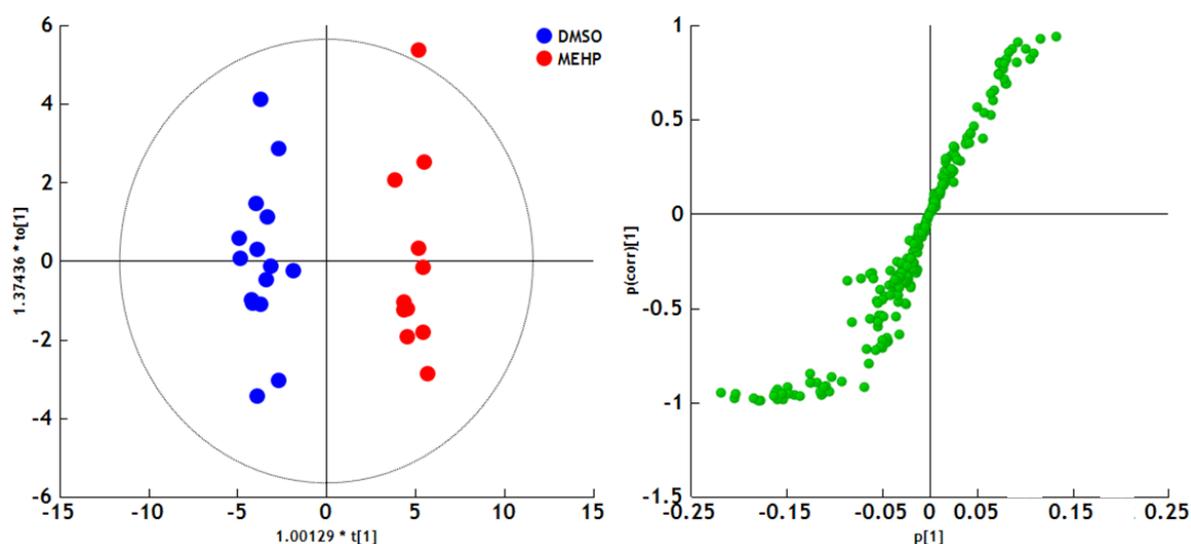


Figure 92 : *Score-plot* et *S-plot* du modèle généré en OPLS-DA

MEHP : groupe correspondant aux cellules incubées en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h,  
DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 72 h ( $< 0,1 \%$  v/v)

Au total, 64 variables ont été retenues selon les critères de  $p(\text{corr})$  et score VIP. Un test univarié (Wilcoxon) suivie d'une correction FDR des  $p\text{-values}$  a ensuite été réalisé sur l'ensemble de ces variables afin de vérifier que l'intensité de chacune d'elles, prises indépendamment, est significativement différente entre les deux groupes d'échantillons. Au final, 58 variables diffèrent significativement ( $p\text{-value} < 0,05$ ) entre le groupe des cellules incubées en présence de MEHP et le groupe des cellules contrôles.

### 3. Annotation des variables

Les 58 variables précédentes ont été annotées à l'aide de la base de données METLIN. Cette étape a permis l'annotation de 23 variables correspondant majoritairement à des acides gras libres et à quelques eicosanoïdes. L'annotation des variables a été confirmée par le temps de rétention après avoir établi une relation linéaire entre  $t_R$  et  $\log P$  à partir d'un mélange d'acides gras libres standards (composition en Annexe 4) (Figure 93).

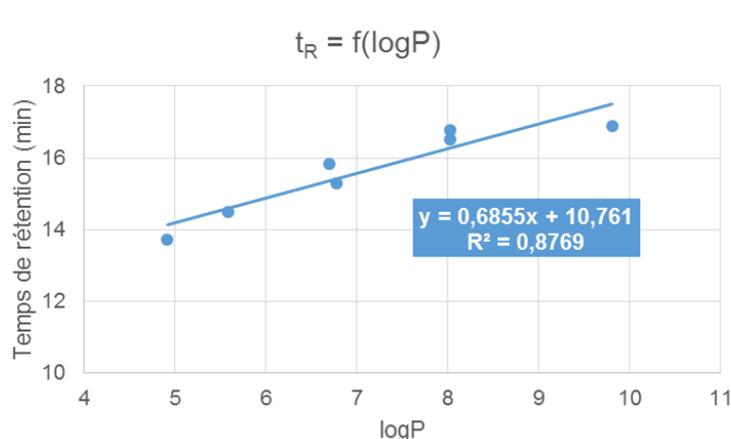


Figure 93 : Relation entre le temps de rétention  $t_R$  et le  $\log P$  pour un mélange d'acides gras libres standards

Cette relation a permis de confirmer l'annotation de 17 des 23 variables annotées plus haut (Tableau 27).

Tableau 27 : Calcul du  $\Delta t_R$  selon la formule reliant le temps de rétention au  $\log P$  pour un mélange d'acides gras libres standards

Nom des variables annotées	Formule	$\log P$	$t_R$ (min)	$t_{R\text{ théo}}$ (min)	$\Delta t_R$
acide dodécadécénoïque	C12:1	3,85	12,56	13,40	6%
acide céto-tridécanoïque	C13:0-céto	4,83	13,21	14,07	6%
acide tridécénoïque	C13:1	4,16	13,04	13,61	4%
acide tridécadiénoïque	C13:2	3,61	11,98	13,23	9%
acide tétradécadiénoïque	C14:2	4,32	13,15	13,72	4%
acide pentadécanoïque	C15:0	5,94	14,68	14,83	1%
acide hexadécanoïque	C16:0	6,26	15,21	15,05	-1%
acide di-oxo-hexadécanoïque	C16:0-dioxo	5,99	14,98	14,86	-1%
acide hexadécadiénoïque	C16:2	5,10	13,98	14,25	2%
acide hexadécatriénoïque	C16:3	4,88	13,53	14,10	4%
acide hydroxyhexadécatriénoïque	C16:3-hydroxy	3,90	12,42	13,43	8%
acide hexadécatétraénoïque	C16:4	3,66	11,86	13,26	11%
acide 12-oxo-heptadécatriénoïque	C17:3-oxo	4,05	11,98	13,53	12%
acide dihydroxystéarique	C18:0-dihydroxy	6,53	13,06	15,23	14%
acide époxyeicosatriénoïques (EET)	C20:3-époxy	5,40	14,40	14,46	0%
acide hydroxyeicosatétraénoïques (HETE)	C20:4-hydroxy	4,51	11,89	13,85	14%
acide oxo-eicosatétraénoïque	C20:4-oxo	5,10	13,68	14,25	4%

Parmi les 17 variables annotées, seules trois sont des dérivées de l'acide arachidonique (C20:4) et appartiennent aux sous-classes EETs et HETEs. L'examen des  $t_R$  relevés pour ces composés a permis de préciser qu'il s'agit très probablement du 8-9-EET et du 8-HETE. Il est à noter que l'acide arachidonique ne fait pas partie des variables retenues. En effet, le dosage de celui-ci ne montre pas de différence significative ( $p\text{-value} > 0,01$ ) du taux de cet acide gras dans les culots cellulaires incubés ou non avec le MEHP (Figure 94).

La voie de métabolisation des eicosanoïdes ne semble donc pas ou très peu modifiée par la présence de MEHP dans les cellules JEG-3.

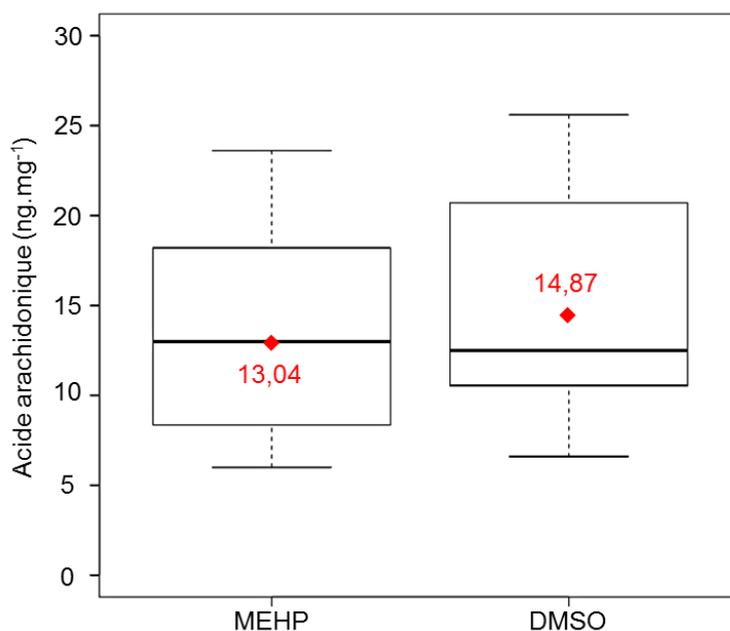


Figure 94 : *Boxplot* du dosage de l'acide arachidonique dans les culots cellulaires incubés en présence de MEHP (MEHP) et les culots cellulaires contrôles (DMSO)  
La quantité d'acide arachidonique est rapportée à la quantité de protéines en mg

La majorité des variables dont l'annotation a été confirmée, correspond à des acides gras libres, notamment des dérivés de l'acide palmitique (C16:0) et de l'acide tridécylique (C13:0) (Tableau 28).

Tableau 28 : Tableau récapitulatif des variables discriminantes annotées

Nom des variables annotées	Formule	Ratio %
acide dodécadécénoïque	C12:1	-93%
acide céto-tridécanoïque	C13:0-céto	+250%
acide tridécénoïque	C13:1	+87%
acide tridécadiénoïque	C13:2	+250%
acide tétradécadiénoïque	C14:2	-78%
acide pentadécanoïque	C15:0	+72%
acide hexadécanoïque	C16:0	+64%
acide di-oxo-hexadécanoïque	C16:0-dioxo	+97%
acide hexadécadiénoïque	C16:2	+82%
acide hexadécatriénoïque	C16:3	+53%
acide hydroxyhexadécatriénoïque	C16:3-hydroxy	+97%
acide hexadécatétraénoïque	C16:4	+65%
acide 12-oxo-heptadécatriénoïque	C17:3-oxo	-88%
acide dihydroxystéarique	C18:0-dihydroxy	+64%
acide époxyeicosatriénoïques (EET)	C20:3-époxy	+53%
acide hydroxyeicosatétraénoïques (HETE)	C20:4-hydroxy	+52%
acide oxo-eicosatétraénoïque	C20:4-oxo	+55%

Le ratio est calculé à partir des intensités moyennes de chaque variable à travers les échantillons d'un même groupe et correspond à la formule :

$$\left[ \frac{\text{Intensité moyenne MEHP} - \text{intensité moyenne DMSO}}{\text{intensité moyenne DMSO}} \right] * 100$$

Les ratios négatifs correspondent donc à des variables dont le taux est diminué dans les cellules incubées en présence de MEHP et les ratios positifs à des variables dont le taux est augmenté dans ce même groupe

Les résultats précédents montrent que la majorité des acides gras voient leur taux, dans les culots cellulaires, augmenté suite à l'incubation en présence de MEHP. Seul le C12:1, le C14:2 et le C17:3-oxo voient leur taux diminués de 86 % en moyenne dans les cellules incubées. Les autres acides gras dérivés des C13, C15, C16, C18 et C20 sont tous largement augmentés dans ces cellules. Les six acides gras en C16 sont augmentés en moyenne de 76 %, les trois acides gras en C13 de 195 % et les trois dérivés de l'acide arachidonique de 53 %. De plus, un certain nombre de ces acides gras correspondent à des dérivés oxydés.

#### IV. Discussion

L'ajustement de paramètres chromatographiques tels que la température de colonne, le débit de phase mobile et le gradient d'élution a permis d'améliorer nettement la séparation des eicosanoïdes du mélange standard. Seules deux molécules isobares n'ont pas pu être séparées : le 14-15-EET et le 5-HETE. L'utilisation d'un plan d'expérience de type plan composite centré a permis de déterminer les paramètres influençant significativement la

sensibilité de détection en spectrométrie de masse et les valeurs optimales de ces paramètres dans le cadre de notre étude. La méthode ainsi développée par SPE-UPLC-MS a été utilisée afin d'analyser les eicosanoïdes présents dans des culots cellulaires incubés ou non avec le MEHP.

L'utilisation d'outils statistiques tels que les analyses statistiques multivariées a permis de ressortir un ensemble de variables d'intensités significativement différentes entre les deux groupes d'échantillons. Sur l'ensemble des variables discriminantes, 17 ont été annotées comme lipides et appartiennent à la famille des acides gras, notamment des acides gras libres à longues chaînes (contenant 12 à 20 carbones), de leurs dérivés oxydés et des eicosanoïdes. Selon la chaîne d'acide gras, ceux-ci sont augmentés ou diminués dans les cellules incubées en présence de MEHP. Néanmoins, la majorité (14 sur 17) voit leur taux largement augmenté, de 96 % en moyenne. Il s'agit principalement des acides gras en C13, C16 et C20. Chez les cellules JEG-3, l'incubation en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h provoque donc une forte accumulation d'acides gras. Comme nous l'avons vu, au niveau du placenta, le MEHP est un ligand exogène qui active le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Celui-ci régule alors des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique placentaire et notamment dans le transport, le stockage et l'oxydation des acides gras <sup>123</sup>. Ainsi, l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP au niveau des cellules JEG-3 semble entraîner une perturbation du métabolisme des acides gras provoquant leur accumulation sous la forme d'acides gras libres, d'acides gras oxydés et d'eicosanoïdes. En 2001, Tarrade *et al.* ont montré que l'activation de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone entraîne une accumulation de lipides neutres sous la forme de triacylglycérols et d'acides gras dans les trophoblastes humains <sup>371</sup>. Des études ont suggéré qu'une telle accumulation peut entraîner une augmentation du transfert de lipides vers le fœtus *via* le placenta, une dyslipidémie et potentiellement, une altération du développement fœtal <sup>372,373</sup>. Les résultats observés sur la lignée placentaire humaine JEG-3 semble donc confirmer le rôle de PPAR $\gamma$  dans la régulation du métabolisme des acides gras suite à son activation par un ligand agoniste exogène. Cependant, la proportion d'eicosanoïdes dont le taux est modifié est très faible puisque seulement trois espèces ont pu être annotées. Aucun lipide de la famille des leucotriènes, prostaglandines et thromboxanes n'est ressorti comme discriminant entre les deux groupes d'échantillons. De plus, la quantité d'acide arachidonique, précurseur commun aux eicosanoïdes, dosé n'est pas significativement modifiée après incubation des cellules avec le MEHP, ce qui semble indiquer un faible effet de ce dernier sur le métabolisme des eicosanoïdes.

## V. Conclusion

La mise au point d'une méthode d'analyse sensible par SPE-UPLC-MS a permis de détecter des eicosanoïdes, des acides gras libres et leur dérivés oxydés à un niveau basal dans les culots cellulaires issus de cellules JEG-3. La comparaison par analyses statistiques entre 15 culots cellulaires incubés en présence de MEHP et 15 culots cellulaires contrôles a permis de sélectionner un ensemble de variables dont l'intensité est significativement différente entre les deux groupes d'échantillons. Ces variables correspondent à des lipides appartenant à la famille des acides gras, regroupant majoritairement des acides gras libres et des dérivés oxydés, mais également quelques eicosanoïdes. Une forte accumulation d'acides gras libres a pu être observée et semble confirmer le rôle du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  dans la régulation du métabolisme lipidique placentaire et notamment dans le transport, le stockage et l'oxydation des acides gras. L'étude ayant été menée sur une lignée cellulaire immortalisée, issues d'un choriocarcinome, les conclusions qui peuvent en être tirées pour le placenta sont probablement réduites. Cependant, l'étude étant comparative, l'utilisation du modèle cellulaire JEG-3 reste pertinente puisqu'une perturbation importante du lipidome de ces cellules a pu être observée suite à la présence de MEHP. L'utilisation de cultures primaires semblerait alors intéressante afin de déterminer si des résultats semblables sont obtenus. Une étude transcriptomique sur les gènes régulant le métabolisme des acides gras pourrait également permettre de mieux comprendre les perturbations observées.

L'activation de PPAR $\gamma$  par des ligands spécifiques entraîne également la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Une étude ciblée sur la famille des oxystérols paraît donc intéressante.

# **Dosage des oxystérols dans les cellules JEG-3**

## I. Introduction

Les oxystérols sont des métabolites intermédiaires issus du catabolisme du cholestérol. Ligands endogènes du récepteur nucléaire LXR $\alpha$  dans le placenta<sup>223</sup>, ces derniers ont un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique et notamment dans l'homéostasie du cholestérol<sup>224,374</sup>. Dans le placenta, PPAR $\gamma$  régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol<sup>127-129</sup>. Il apparaît donc intéressant d'étudier les oxystérols comme marqueurs potentiels de l'effet du MEHP sur le métabolisme du cholestérol, dans les cellules placentaires humaines JEG-3.

Les oxystérols sont des lipides apolaires dont la seule fonction ionisable en spectrométrie de masse est un groupement hydroxyle secondaire. L'utilisation d'une source ESI est peu adaptée à cette famille de molécule et ne permet pas d'atteindre des limites de détection très performantes. De fait, une méthode d'analyse, incluant une étape de dérivation des oxystérols, a été développée en 2012 au sein du laboratoire et a permis d'atteindre des seuils de détection de l'ordre du nanomolaire<sup>248</sup>. Cette méthode a donc été appliquée à la quantification des oxystérols dans cinq culots cellulaires incubés en présence de MEHP et cinq culots contrôles. Néanmoins, l'étape de dérivation n'étant pas effective sur le 7-kéto, l'utilisation d'une source APPI est alors nécessaire. De même, le cholestérol, conduisant à une saturation du signal en ESI, est analysé en APPI, plus adaptée à l'analyse de molécules à caractère hydrophobes.

## II. Matériel et méthodes

Un mélange contenant cinq oxystérols (24(S)-OH, 25-OH, 27-OH, 7 $\beta$ -OH, 7-kéto) et le cholestérol (CHO) à 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  a servi afin de préparer chacun des dix points de gamme de 7,5 à 3 750  $\text{nmol.L}^{-1}$ . Un mélange de quatre étalons internes (24-OH-d7, 7 $\beta$ -OH-d7, 7-kéto-d7, CHO-d7) a été préparé à 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  et a permis de calculer les ratios étalons internes/oxystérols (EI/oxy).

### A. Préparation des échantillons

Le dosage des oxystérols a été effectué sur 5 culots cellulaires incubés en présence de MEHP et 5 culots cellulaires contrôles. Tous les culots cellulaires ont été repris et broyés dans l'eau. Une partie du surnageant (20  $\mu\text{L}$ ) a été utilisée pour effectuer le dosage de protéines, une autre partie (20  $\mu\text{L}$ ) a été diluée au 1/1 000 pour doser le cholestérol présent en grande quantité et le reste du surnageant (500  $\mu\text{L}$ ) a été utilisé pour doser les oxystérols. L'extraction de la famille de lipides a été réalisée par LLE avec un mélange hexane/MeOH 7:1 (v/v), sous agitation durant 40 min. Après centrifugation à 1 500 rpm pendant 10 min, la phase organique

a été récupérée et évaporée à sec sous pression réduite (SpeedVac®, Thermo Fisher Scientific, France). Les résidus secs ont été repris dans une solution de dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) contenant l'agent de dérivation *N*-(diméthylamino)phényl-isocyanate (DMAPI) à 10 mg.mL<sup>-1</sup> et de la triéthylamine (TEA) à 30 % en volume. La réaction est présentée en Figure 95. Les échantillons ont été incubés et agités pendant 2 h à 65 °C. Du tampon phosphate à pH 8 a été ajouté afin de stopper la réaction. Les oxystérols dérivés ont été extraits avec de l'hexane. Après agitation et centrifugation à 2 500 rpm pendant 20 min, la phase organique a été récupérée et évaporée comme précédemment. Les résidus secs ont été repris dans un mélange ACN/IPr 50:50 (v/v) avant d'être analysés à l'aide du système UPLC-MS. La gamme a été réalisée suivant le même protocole de dérivation et d'extraction que les échantillons.

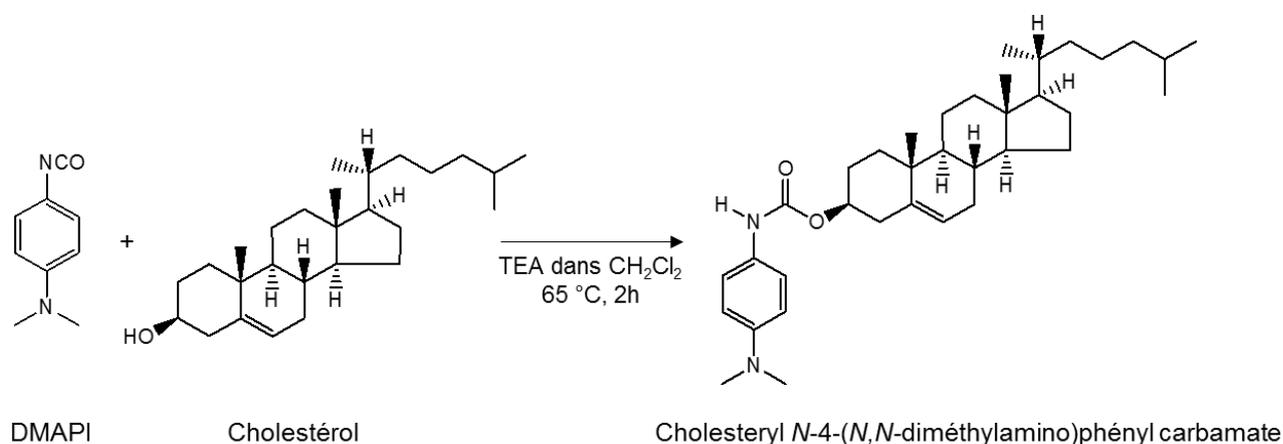


Figure 95 : Schéma de la réaction de dérivation entre le DMAPI et le cholestérol

## B. Analyse UPLC-MS

La séparation du mélange d'oxystérols a été effectuée en UPLC sur une colonne CSH™ C<sub>18</sub> (100 x 2,1 mm ; 1,7 μm) équipée d'une précolonne CSH™ C<sub>18</sub> maintenue à 70 °C. La phase mobile constituée d'un solvant A, AF à 0,01 % (v/v) dans l'eau et d'un solvant B, ACN/MeOH 70/30 (v/v), a été utilisée suivant le gradient décrit ci-dessous (Figure 96). Le débit a été fixé à 0,4 mL.min<sup>-1</sup>. La durée d'une analyse, incluant le temps de rééquilibrage de la colonne est de 13 min.

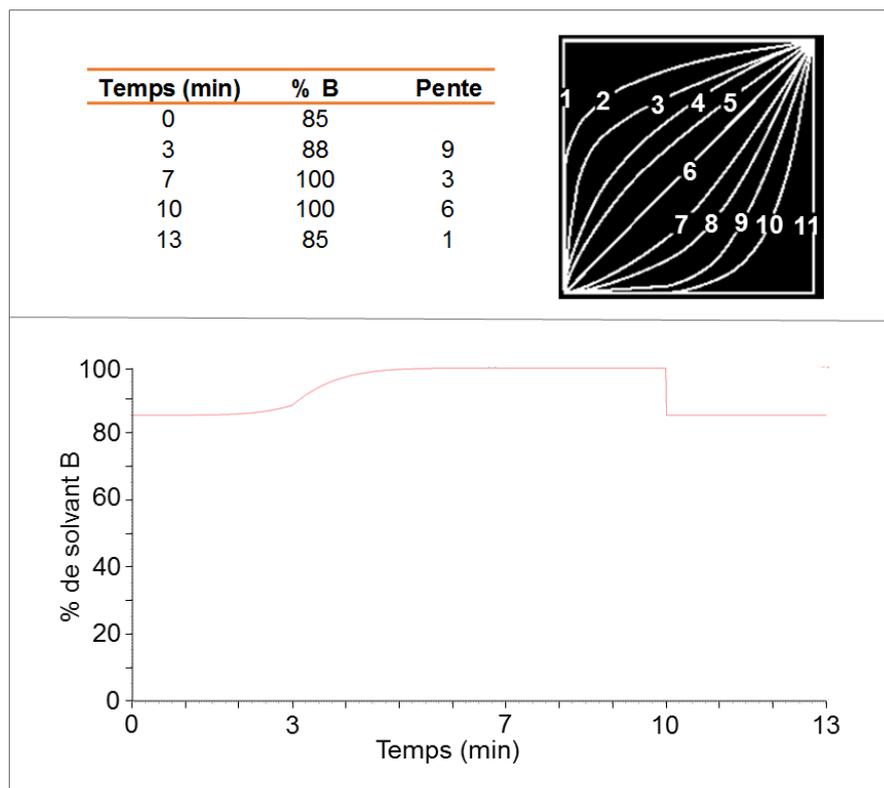


Figure 96 : Gradient chromatographique utilisé pour l'analyse des oxystérols par UPLC-ESI-MS

Les oxystérols ont été ionisés par électronébulisation en mode positif puis analysés à l'aide d'un analyseur hybride Q-TOF (Synapt® G2 High Definition MS™, Waters, Manchester, UK). Les paramètres de sources ont été fixés comme suit :

- tension du capillaire : 2,50 kV ;
- tension du cône d'extraction : 4 V ;
- tension du cône d'échantillonnage : 40 V
- débit du flux d'azote pour la désolvatation : 900 L.h<sup>-1</sup> ;
- débit du flux d'azote sur le cône d'échantillonnage : 20 L.h<sup>-1</sup> ;
- température de désolvatation : 600 °C ;
- température de source : 120 °C.

Dans les conditions précédentes, la dérivation n'étant effective pour le 7-kéto (fonction cétone et non hydroxyle) et une saturation du signal étant observée pour le CHO, une autre méthode d'analyse, par UPLC-APPI-MS a donc été employée. La séparation chromatographique a été effectuée sur la même colonne CSH™ C<sub>18</sub> (100 x 2,1 mm ; 1,7 µm) maintenue à 70 °C. Une phase mobile composée d'un solvant A, AF à 0,01 % (v/v) dans l'eau et d'un solvant B, ACN/MeOH 40/60 (v/v) a été utilisé. Le débit a été fixé à 0,6 mL.min<sup>-1</sup> pour une durée d'analyse de 16 min selon le gradient d'éluion suivant (Figure 97) :

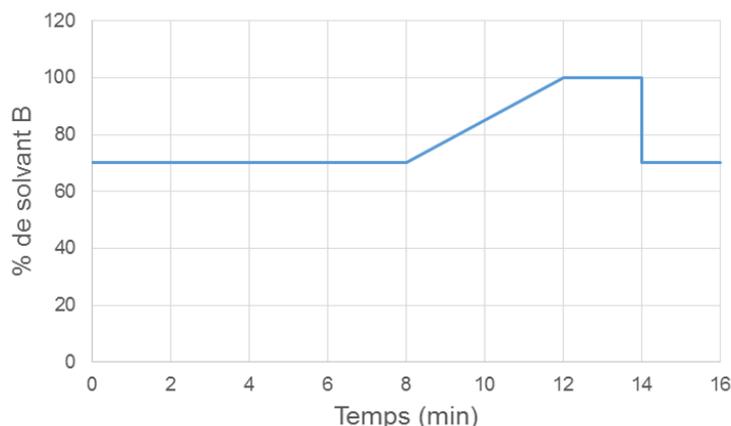


Figure 97 : Gradient chromatographique utilisé pour l'analyse du cholestérol et du 7-kéto par UPLC-APPI-MS

Les molécules ont ensuite été ionisées en mode positif dans une source APPI. Les paramètres de sources ont été fixés comme suit :

- tension du capillaire : 3,00 kV ;
- tension du cône d'extraction : 4 V ;
- tension du cône d'échantillonnage : 40 V
- débit du flux d'azote pour la désolvatation : 900 L.h<sup>-1</sup> ;
- débit du flux d'azote sur le cône d'échantillonnage : 20 L.h<sup>-1</sup> ;
- température de désolvatation : 600 °C ;
- température de source : 120 °C.

L'anisole à 0,5 % (v/v) dans le toluène a été utilisé comme dopant afin de favoriser l'ionisation des molécules.

### C. Traitement des données

Une gamme de concentration a été réalisée pour chaque mode d'ionisation et le ratio des aires sous la courbe des pics chromatographiques étalon interne/oxystérol (EI/oxy) a été calculé pour chaque oxystérol afin de pouvoir les doser dans les culots cellulaires. La quantité d'oxystérols a été rapportée à la quantité de protéines dosée par la méthode BCA. Une analyse statistique univariée (Wilcoxon), à un risque  $\alpha$  de 1 %, a été menée sur les quantités d'oxystérols retrouvées dans les cellules incubées et les cellules contrôles.

### III. Résultats

#### A. Analyse UPLC-MS

L'analyse en UPLC-ESI-MS mise au point a permis de séparer les hydroxycholestérols (24(S)-OH, 25-OH, 27-OH, 7 $\beta$ -OH), isomères de positions en moins de 5 min (Figure 98). Le 7-kéto et le CHO ont, quant à eux, été dosés en UPLC-APPI-MS, plus adaptée à l'analyse de molécules hydrophobes.

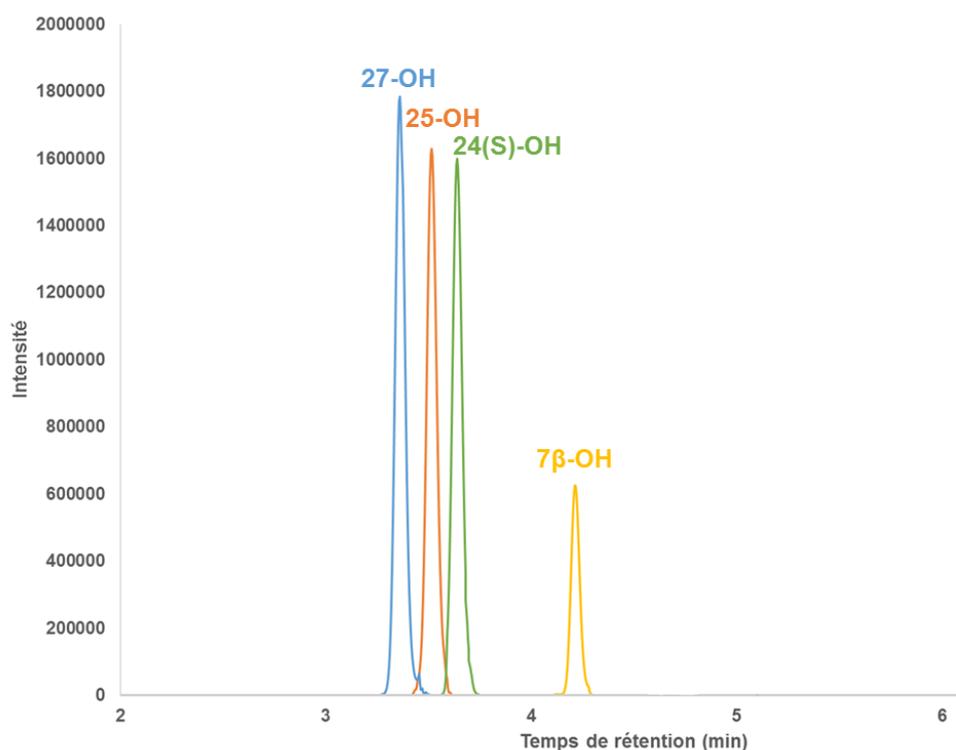


Figure 98 : Séparation chromatographique du mélange standard d'oxystérols dans les conditions mises au point <sup>248</sup>

#### B. Traitement des données

La gamme préparée à partir du mélange standard d'oxystérols s'étend de 7,5 à 3 750 nmol.L<sup>-1</sup>, représentant dix points au total. Les ratios reportés lors du dosage du 24(S)-OH, 25-OH, 27-OH et 7 $\beta$ -OH étant faibles, seuls les points bas de la gamme ont été utilisés. En revanche pour le CHO et le 7-kéto, les ratios étant plus élevés, les points hauts de la gamme ont également été considérés (Figure 99).

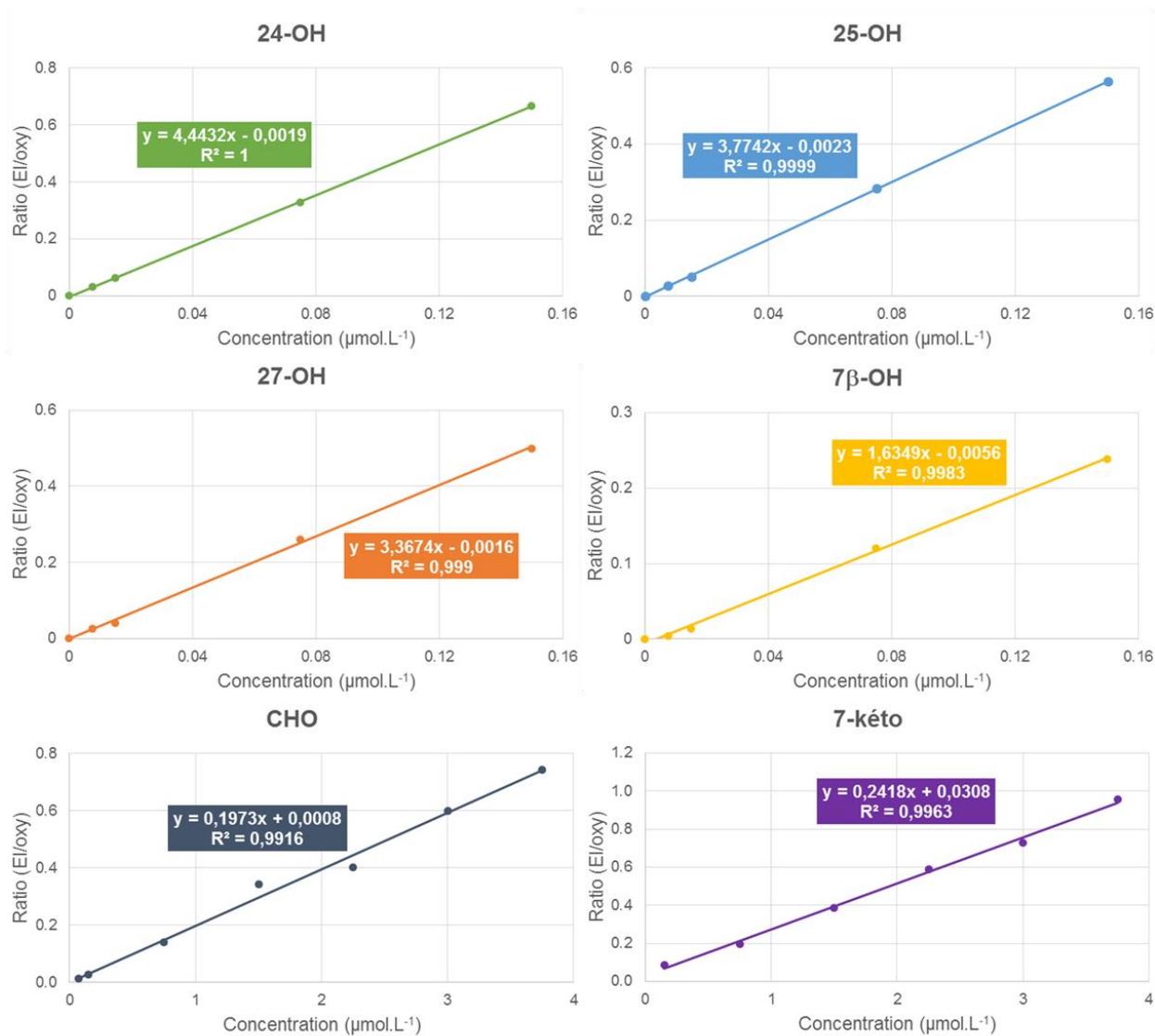


Figure 99 : Gammes d'étalonnage pour le dosage des oxystérols

Les valeurs des  $R^2$  montrent que la méthode est linéaire sur les gammes de concentration testées. Les résultats du dosage des différents oxystérols sont présentés ci-dessous (Tableau 29) :

Tableau 29 : Dosage des oxystérols dans les culots cellulaire JEG-3 incubés en présence de MEHP et dans les culots cellulaires contrôles

Oxystérols	culots MEHP	culots DMSO
	quantité oxystérols/quantité protéines ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	quantité oxystérols/quantité protéines ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )
24(S)-OH	0,24 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,10
25-OH	0,26 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,05
27-OH	0,12 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01
7 $\beta$ -OH	1,72 $\pm$ 0,65	2,64 $\pm$ 0,54

Oxystérols	culots MEHP	culots DMSO
	quantité oxystérols/quantité protéines ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	quantité oxystérols/quantité protéines ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
7-kéto	0,57 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,08
CHO	50 $\pm$ 13	54 $\pm$ 17

Aucune différence significative de la quantité d'oxystérols n'est observée entre les culots cellulaires incubés en présence de MEHP et les culots contrôles ( $p\text{-value} > 0,01$  pour chaque oxystérol). Le MEHP ne semble pas avoir d'effet significatif sur le métabolisme lié au cholestérol dans les cellules JEG-3. Le dosage effectué révèle une différence marquée entre les stérols étudiés. En effet, les quantités de 7-kéto et de CHO mesurées sont 1 000 à 100 000 fois plus élevées que celles des autres oxystérols.

#### IV. Discussion

D'après les résultats, la quantité moyenne de 24(S)-OH et de 25-OH retrouvée dans les culots cellulaires est de 0,27  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , celle de 27-OH de 0,13  $\mu\text{g.g}^{-1}$  et celle de 7 $\beta$ -OH de 2,18  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Ces oxystérols sont donc présents en quantité similaire dans les culots cellulaires JEG-3, à l'exception du 7 $\beta$ -OH dont la concentration est dix fois plus élevée. Le 7-kéto est présent à 0,59  $\text{mg.g}^{-1}$  en moyenne dans les mêmes culots cellulaires et le CHO à 52  $\text{mg.g}^{-1}$ , soit à des concentrations 1 000 à 100 000 fois plus élevées que les autres oxystérols. Des résultats similaires ont été retrouvés par Olivier *et al.* sur des lignées cellulaires de kératinocytes<sup>375</sup> et des cellules épithéliales de rétines<sup>376</sup>. La quantification d'oxystérols dans des érythrocytes humains<sup>377</sup> et des lignées cellulaires pancréatiques humaines<sup>378</sup> a également menée à des résultats comparables.

La présence de CHO à des concentrations bien plus élevées que ses métabolites peut s'expliquer par l'abondance de ce stérol dans l'organisme, majoritairement à l'état libre et par son rôle de précurseur dans la biosynthèse des oxystérols.

Contrairement aux autres oxystérols générés par voies enzymatiques, le 7-kéto et le 7 $\beta$ -OH sont produits chimiquement à partir du CHO par des mécanismes d'auto-oxydation<sup>221,374</sup>. Le 7-kéto est considéré comme l'oxystérol majoritaire composant les

LDL oxydées<sup>379,380</sup>. Des études ont montré qu'une internalisation des LDL a lieu au niveau du placenta et également dans les lignées cellulaires issues de choriocarcinome, telles que les cellules JEG-3<sup>381,382</sup>. Ces LDL étant plus susceptibles à l'oxydation durant la grossesse, une forte présence de LDL oxydées est reportée dans le placenta ; ces dernières fournissant de nombreux ligands pour les récepteurs nucléaires tels que PPAR $\gamma$  et LXR $\alpha$ <sup>383,384</sup>. De fait, la présence de LDL oxydées dans les cellules JEG-3 peut expliquer la quantité élevée de 7-kéto dosée dans ces cellules. Les 24(S)-OH, 25-OH, 27-OH et 7 $\beta$ -OH n'étant pas majoritaires dans les LDL oxydées, leur concentration basale dans les cellules JEG-3 est beaucoup plus faibles et provient uniquement de la métabolisation enzymatique du cholestérol dans le placenta.

La comparaison entre la concentration en oxystérols dosés dans les culots cellulaires incubés en présence de MEHP et dans les culots cellulaires contrôles ne montre aucune différence significative. L'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP ne semble donc pas impacter le métabolisme de ces molécules dans les cellules placentaires. De nombreuses études ont souligné l'implication de PPAR $\gamma$  dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. En 2005, Quinn *et al.* ont montré que l'activation de PPAR $\gamma$  sur une lignée cellulaire humaine et sur une culture primaire de monocytes, entraîne une augmentation de l'expression du gène CYP27A1 (*cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1*)<sup>385</sup>. Ce dernier code pour l'enzyme CYP27A1 (cholestérol 27-hydrolase) impliquée dans la biosynthèse du 27-OH. Plus récemment, en 2012, l'équipe de Duan *et al.* a mis en évidence l'expression du gène CYP7A1 (*cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1*) dans le foie humain suite à l'activation de PPAR $\gamma$ <sup>386</sup>. Ce gène code, quant à lui, pour l'enzyme CYP7A1 (cholestérol 7 $\alpha$ -hydrolase) permettant la biosynthèse du 7 $\alpha$ -OH. De fait, une étude du niveau d'expression des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol ainsi qu'une étude transcriptomique sur les gènes codant pour ces enzymes pourrait permettre de comprendre les chemins métaboliques perturbés, ou non, suite à l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP dans les cellules JEG-3.

De plus, un autre récepteur nucléaire, LXR $\alpha$ , est également exprimé dans le placenta<sup>96,383</sup>. Ce récepteur, à l'instar de PPAR $\gamma$ , est impliqué dans la biosynthèse des lipides et particulièrement du cholestérol. Parmi ses ligands endogènes sont retrouvés les oxystérols et notamment le 7-kéto libéré à partir des LDL oxydées. Des études récentes ont mis en évidence les modulations de ce récepteur nucléaire par des petites molécules telles que des drogues pharmaceutiques ou des polluants chimiques. En 2015, Mozzicafreddo *et al.* ont étudié l'interaction potentielle entre des contaminants environnementaux, tels que les phtalates et LXR $\alpha$ <sup>387</sup>. Les résultats ont révélé une interaction spécifique entre le récepteur nucléaire et différents polluants, pouvant de fait affecter l'expression des gènes cibles de LXR $\alpha$  et ainsi altérer l'homéostasie des lipides. Cette étude ne montre, en revanche, pas d'interaction entre le MEHP et LXR $\alpha$ . À ce jour, une seule étude a mis en exergue l'activation de LXR $\alpha$  par le

MEHP dans les appareils génitaux fœtaux <sup>181</sup>. Ainsi, il semblerait intéressant d'élargir l'étude au récepteur LXR $\alpha$  et à son activation potentielle par le MEHP.

## V. Conclusion

La mise au point d'une méthode d'analyse combinant une étape de dérivation des oxystérols, une extraction liquide-liquide et une analyse par UPLC-MS a permis de détecter et quantifier le cholestérol et cinq métabolites oxydés dans des culots cellulaires JEG-3. Les quantités retrouvées sont de l'ordre du  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de protéines pour quatre d'entre eux et du  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de protéines pour le 7-kéto et le CHO. Cette différence peut s'expliquer par la présence de LDL oxydées dans les cellules placentaires libérant une grande quantité de 7-kéto. Le CHO est, quant à lui, précurseur des oxystérols et présent en abondance dans l'organisme. Le dosage des oxystérols a été effectué dans des culots cellulaires incubés ou non en présence de MEHP. Une étude comparative a été menée, par analyse statistique univariée, et n'a montré aucune différence de concentrations entre les deux groupes d'échantillons. L'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  par le MEHP ne semble donc pas impacter le métabolisme du cholestérol dans les cellules JEG-3. Afin de confirmer ces observations, des études transcriptomiques et protéomiques sur les gènes et enzymes impliqués dans ce métabolisme pourraient être pertinentes. De plus, le rôle prédominant de LXR $\alpha$  dans le métabolisme du cholestérol et son activation par les oxystérols font de ce récepteur un autre axe d'étude intéressant. Une potentielle activation de ce dernier par le MEHP pourrait avoir des effets agonistes ou antagonistes à ceux observés avec PPAR $\gamma$ . Une étude approfondie sur la modulation de LXR $\alpha$  pourrait apporter des informations complémentaires très utiles.

# Analyse transcriptomique

## I. Introduction

Les résultats des analyses lipidomiques effectuées sur la lignée cellulaire JEG-3, ont mis en évidence un changement important du lipidome de ces cellules consécutif à l'incubation en présence de MEHP. Les résultats obtenus ont permis d'orienter une analyse transcriptomique par RT-qPCR vers certains des gènes codant pour les protéines qui contrôlent les voies de biosynthèses probablement modifiées.

Cette étude a été réalisée en étroite collaboration avec Delphine Dargère de l'UMR 8638 Ingrid Laurendeau de l'EA 7331.

## II. Matériel et méthodes

Les cellules JEG-3 ont été incubées à deux concentrations différentes de MEHP,  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , durant 6 h et 72 h. Les cellules contrôles ont été incubées en présence de DMSO ( $< 0,1 \%$  v/v) pendant 6 h et 72 h. Quatre répliques biologiques ont été préparés pour chacune des six conditions.

Dans un premier temps les ARN ont été extraits selon la méthode mise au point par Piotr Chomczynski et Nicoletta Sacchi<sup>388,389</sup> (RNAble, Eurobio Life Science). Ces derniers ont été dosés en vue d'effectuer la rétrotranscription. À l'issue de cette étape, les ADNc (ADN complémentaires) ont été qualifiés et quantifiés. La PCR quantitative a été effectuée à l'aide d'un système de détection de séquence ABI Prism 7 900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les amorces (Annexe 5) ont été achetées chez Life Technologie (Thermo Fischer Scientific). La quantification des ARN a été obtenue selon la méthode publiée par Pasmant *et al.*<sup>390</sup>. Des analyses statistiques univariées (Wilcoxon) ont été réalisées avec un risque  $\alpha$  de 5 % afin de comparer les résultats obtenus entre les échantillons incubés en présence de MEHP et les échantillons contrôles.

La liste des gènes étudiés est présentée ci-dessous (Tableau 30). Le gène LOX, codant pour la lysyl oxydase a été utilisé comme gène de référence afin de confirmer l'activation de PPAR $\gamma$ . En effet, il a été prouvé que l'expression de ce gène est significativement augmentée suite à l'activation du récepteur<sup>128</sup>. N'étant pas impliqué dans le métabolisme lipidique placentaire, ce gène constitue donc une bonne référence.

Les autres gènes étudiés ont été choisis sur la base des résultats obtenus lors de l'analyse lipidomique, ils codent pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des glycérolipides et des glycérophospholipides, correspondant aux classes discriminantes majoritairement retrouvées. En raison de la grande diversité des gènes du métabolisme lipidique, seuls ceux dont l'expression placentaire a été rapportée dans la littérature ont été sélectionnés. Ainsi, un gène codant pour les phospholipases A1 a été étudié, quatre pour les phospholipases A2, un

pour les phospholipases C, trois pour les phospholipases D, trois pour les monoacylglycérol acyltransférases et deux pour les diacylglycérol acyltransférases.

Tableau 30 : Liste des 15 gènes étudiés lors de l'analyse transcriptomique

Description	Symbole du gène
Lysyl oxydase	LOX
Phospholipase A1 membre A	PLA1A
Phospholipase A2 groupe IIA	PLA2G2A
Phospholipase A2 groupe III	PLA2G3
Phospholipase A2 groupe V	PLA2G5
Phospholipase A2 groupe XIA	PLA2G12A
Phospholipase C gamma I	PLCG1
Phospholipase D membre 1	PLD1
Phospholipase D membre 2	PLD2
Phospholipase D membre 3	PLD3
Monoacylglycérol acyltransférase 1	MGAT1
Monoacylglycérol acyltransférase 2	MGAT2
Monoacylglycérol acyltransférase 3	MGAT3
Monoacylglycérol lipase	MGLL
Diacylglycérol acyltransférase 1	DGAT1
Diacylglycérol acyltransférase 2	DGAT2

### III. Résultats

Les résultats présentés ne concernent que les cellules incubées en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h. Les autres données sont en cours d'analyse.

Dans ces conditions expérimentales, neuf des 15 gènes étudiés voient leur expression significativement augmentée ou diminuée dans les cellules JEG-3. Les résultats obtenus confirment bien l'augmentation de l'expression du gène LOX suite à l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP puisque celle-ci est augmentée d'un facteur 1,70 (*Tableau 31*). Les autres gènes sur-exprimés sous l'effet du MEHP codent pour les phospholipases A1, A2, C, D1 et D2 ainsi que les diacylglycérol acyltransférases 1 et 2 (*Tableau 31*).

Tableau 31 : Gènes dont l'expression est significativement augmentée ou diminuée dans les cellules JEG-3 suite à une incubation de 72 h à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MEHP ( $p\text{-value} < 0,05$ )

Ratio MEHP/DMSO	Description	Symbole du gène
1,70	Lysyl oxydase	LOX
1,51	Phospholipase A2 G3	PLA2G3
1,47	Diacylglycérol acyltransférase 1	DGAT1
1,24	Diacylglycérol acyltransférase 2	DGAT2
0,84	Monoacylglycérol lipase	MGLL
0,82	Phospholipase D1	PLD1
0,77	Phospholipase C G1	PLCG1
0,75	Phospholipase A1 A	PLA1A
0,70	Phospholipase D2	PLD2

La plus grande augmentation d'expression concerne le gène PLA2G3, codant pour la phospholipase A2 (groupe III), puisque son expression varie d'un facteur 1,51. Les DGAT 1 et 2 voient leur expression significativement augmentée respectivement d'un facteur 1,47 et 1,24 dans ces cellules. Les autres gènes codant pour les phospholipases et la monoacylglycérol lipase sont sous-exprimés dans les cellules incubées avec le MEHP. Il est à noter que sur les 15 gènes étudiés l'expression de certains n'a pas été mise en évidence dans nos conditions expérimentales ; c'est le cas des gènes codant pour les MOGAT1, 2 et 3, la PLA2G5 et la PLA2G2A. Pour le gène codant pour la PLD3, les résultats ne sont pas significatifs.

#### IV. Discussion

Les résultats de l'analyse transcriptomique, réalisée sur la lignée cellulaire JEG-3 incubée 72 h en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , ont donc montré un changement dans l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme lipidique placentaire, comme dans le cas des gènes codant pour les DGAT1 et 2. Ce résultat pourrait expliquer l'un de ceux obtenus par l'analyse lipidomique globale, à savoir une augmentation significative du taux de TGs. En effet, la biosynthèse des TGs est régulée par les DGAT, une accumulation de ces lipides pourrait donc être due à une activité enzymatique accrue associée à la sur-expression des gènes correspondants. Cependant, le métabolisme lipidique reste complexe et des interrelations métaboliques sont également très certainement à considérer.

Parmi les gènes dont l'expression est modifiée par la présence de MEHP, la majorité codent pour des enzymes appartenant à la famille des phospholipases. Ces dernières hydrolysent les glycérophospholipides en agissant sur quatre sites de clivage principaux <sup>391</sup> (Figure 100).

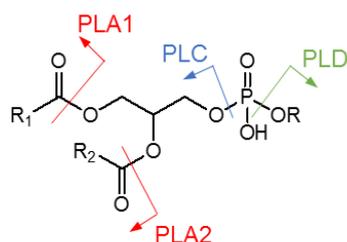


Figure 100 : Sites de coupure des phospholipases sur la classe des glycérophospholipides  
 PLA1 : phospholipase A1, PLA2 : phospholipase A2, PLC : phospholipase C, PLD : phospholipase D,  
 R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> : chaînes acylées, R : choline, éthanolamine, sérine, glycérol, inositol ou hydrogène

Les phospholipases A1 et A2 catalysent l'hydrolyse des liaisons ester reliant les acides gras au squelette glycérol, libérant ainsi les acides gras et les lysophospholipides correspondant. Les résultats obtenus indiquent que les gènes codant pour la PLA2 (groupe III) et la PLA1 (membre A) voient leur expression modifiée par la présence de MEHP. L'expression du gène PLA2G3 est significativement augmentée d'un facteur 1,51 dans ces cellules tandis que celle du gène PLA1A est diminuée d'un facteur 0,75. Les résultats de l'analyse lipidomique ont mis en exergue une perturbation du taux de certains lysophospholipides et de certains acides gras. Cette perturbation pourrait, de fait, provenir de la modulation de l'expression des gènes PLA2G3 et PLA1A.

Les résultats de l'analyse transcriptomique (Figure 101) montrent également que l'expression des gènes codant pour les phospholipases D1 et D2 est significativement diminuée. Ces enzymes conduisent à la libération d'acide phosphatidique en catalysant l'hydrolyse de la liaison entre la tête polaire des glycérophospholipides et le phosphate. La sous-expression de ces gènes pourrait expliquer les perturbations lipidiques observées, notamment les modifications du taux de certaines phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines. Le gène PLCG1 codant pour la phospholipase C (gamma I) voit son expression diminuée d'un facteur 0,77 dans les cellules JEG-3 incubées en présence de MEHP. La phospholipase C catalyse l'hydrolyse de la liaison phosphodiester des glycérophospholipides, avec formation de diacylglycérols. Les résultats de l'analyse lipidomique, montrant une diminution du taux de certains DGs après incubation des cellules en présence de MEHP, pourraient être expliqués par une diminution de l'activité enzymatique phospholipase C, elle-même due à la sous-expression du gène codant pour cette enzyme.

Enfin, l'expression du gène MGLL codant pour la monoacylglycérol lipase est diminuée d'un facteur 0,84 dans les cellules incubées en présence du phtalate. Un résultat similaire a été constaté par Segon *et al.* lors de l'activation de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone dans des cultures primaires de trophoblastes <sup>128</sup>. Cette enzyme catalyse la formation de glycérol et d'acides gras libres à partir de monoacylglycérols. Les résultats de notre étude lipidomique ayant mis en évidence une accumulation d'acides gras libres dans les cellules et une

diminution du taux de MGs, coïncideraient plutôt avec une augmentation de l'activité de la MGLL et donc potentiellement une sur-expression du gène correspondant. Ces résultats en apparence contradictoires traduisent très certainement l'intervention d'autres voies métaboliques.

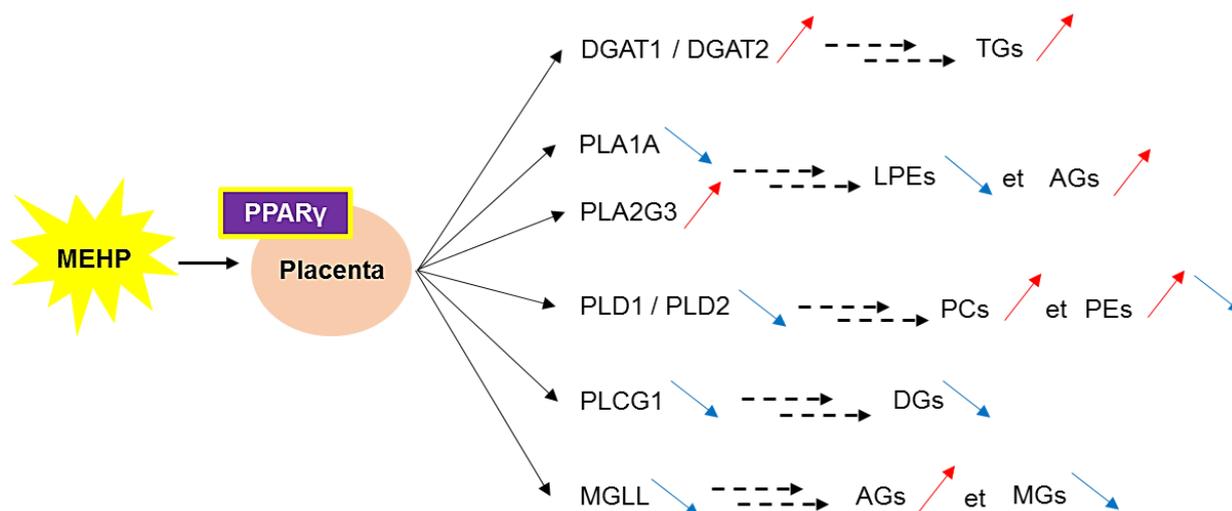


Figure 101 : Schéma récapitulatif des gènes dont l'expression est modifiée par la présence de MEHP et leur lien potentiel avec les perturbations du lipidome observées lors de l'analyse lipidomique

## V. Conclusion

Les résultats obtenus lors de l'analyse lipidomique réalisée dans notre étude ont permis d'orienter une étude transcriptomique en ciblant certains gènes impliqués dans le métabolisme lipidique placentaire. Parmi les 15 gènes étudiés, l'expression de neuf d'entre eux est significativement modulée par la présence de MEHP lors de l'incubation des cellules JEG-3. Ces gènes codent pour les enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique placentaire et notamment dans la biosynthèse des glycérolipides et des glycérophospholipides. Les résultats obtenus par cette approche ont permis de mettre en relation les perturbations du lipidome mises en évidence avec celles de l'expression des gènes étudiés. L'augmentation marquée du taux de TGs dans ces cellules pourrait ainsi être liée à la sur-expression des gènes codant pour les DGAT 1 et 2 et les perturbations du métabolisme des glycérophospholipides pourraient, quant à elles, être dues aux modulations de l'expression des gènes codant pour les différentes phospholipases.

La RT-qPCR a donc permis d'obtenir des informations qui corroborent et complètent les résultats obtenus lors de l'analyse lipidomique. En s'appuyant sur l'analyse du lipidome, l'analyse transcriptomique permet de préciser davantage les voies métaboliques modifiées par la présence du MEHP. Cependant, des interrelations métaboliques sont très certainement mises en jeu et ne peuvent être étudiées que par l'analyse des activités enzymatiques. La

combinaison des différents types d'analyses « omiques » est nécessaire afin de comprendre rigoureusement l'effet du MEHP sur les voies de métabolisation et de biosynthèses des lipides dans les cellules JEG-3.



Les différentes études analytiques effectuées sur le modèle cellulaire JEG-3 ont permis d'explorer le lipidome de ces cellules et notamment d'appréhender les perturbations lipidiques liées à la présence d'un contaminant chimique. Des études préliminaires réalisées par le Dr Anaïs Wakx ont mis en évidence la faible cytotoxicité du MEHP lors d'une incubation des cellules JEG-3 à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h. Ces conditions de culture ont donc été adoptées pour toutes nos études. Ainsi, 40 cultures de cellules incubées en présence de MEHP dans ces conditions et 40 cultures de cellules contrôles, *i.e.* incubées en présence de DMSO, ont été préparées. La mise au point d'une méthode de dosage sensible et robuste a permis par la suite de contrôler l'exposition effective des cellules, par quantification du MEHP dans le milieu de culture et dans les culots cellulaires. Cette méthode a également pu être appliquée au dosage du phtalate dans des villosités issues de placentas à terme.

Afin de rechercher d'éventuelles perturbations lipidiques de ces cellules, une analyse lipidomique globale a été réalisée, permettant l'étude des classes des glycérolipides, des glycérophospholipides, des acides gras et des sphingolipides. Les résultats obtenus ont confirmé l'hypothèse émise puisqu'une perturbation marquée du lipidome des cellules JEG-3 a été observée, traduite notamment par une augmentation significative du taux de triacylglycérols. Suite à cette étude, un intérêt particulier a été porté à la classe des acides gras et notamment aux eicosanoïdes. Une méthode d'analyse de ces derniers a alors été développée et a permis de rechercher ces molécules dans les culots cellulaires. Une importante accumulation d'acides gras a été observée dans les cellules JEG-3 incubées avec le MEHP, correspondant particulièrement à des acides gras libres et leurs dérivés oxydés. Enfin, une analyse plus ciblée sur la classe des stérols a été réalisée par dosage du cholestérol et de cinq oxystérols dans les culots cellulaires. Aucune différence significative quant au taux de ces molécules n'a été reportée dans ces cellules. La présence de MEHP ne semble donc pas agir sur le métabolisme du cholestérol dans les cellules JEG-3.

L'ensemble des résultats obtenus a donc permis de mettre en évidence un effet important du MEHP sur le lipidome des cellules JEG-3. Connaissant le rôle essentiel du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique placentaire et son activation par le MEHP dans les conditions de notre étude, l'hypothèse selon laquelle les perturbations lipidiques observées seraient dues à l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP peut être émise. Afin de valider, en partie, cette hypothèse, une étude transcriptomique a été réalisée sur certains gènes impliqués dans les régulations du métabolisme lipidique placentaire et ciblés grâce à l'analyse lipidomique. Les résultats de cette analyse ont montré une dérégulation de l'expression de certains de ces gènes dans les cellules incubées 72 h en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . En particulier, le gène codant pour la DGAT, enzyme essentielle à la biosynthèse des TGs, voit son expression augmentée dans ces cellules, corroborant ainsi l'augmentation significative du taux de TGs observé par

l'analyse lipidomique. Les résultats de l'analyse transcriptomique confirment donc ceux obtenus lors de l'analyse lipidomique puisqu'il est fort probable que les changements observés au niveau lipidique correspondent à une dérégulation de l'expression de certains des gènes codant pour les protéines impliquées dans les voies de biosynthèses des lipides dérégulés. Une étude de l'activité des différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces lipides semble alors pertinente afin de comprendre les voies métaboliques effectivement modifiées par la présence de MEHP et menant aux perturbations lipidiques observées.

L'utilisation du modèle cellulaire JEG-3, lignée cellulaire issue d'un choriocarcinome placentaire humain, a permis de mettre en évidence, par une étude comparative, l'effet d'un contaminant chimique, perturbateur endocrinien et reprotoxique, sur le lipidome de ces cellules. Cependant, le métabolisme de cellules issues d'une lignée cancéreuse est généralement modifié, par conséquent l'extrapolation des résultats obtenus à partir des cellules JEG-3 aux cellules constituant le placenta normal peut être sujette à caution. Afin de lever cette ambiguïté, dans la suite de l'étude, une analyse lipidomique a été réalisée sur des cellules issues de cultures primaires de trophoblastes et les résultats ont ainsi pu être comparés à ceux obtenus sur la lignée cellulaire JEG-3.

# **Analyse lipidomique globale sur des cultures primaires de trophoblastes**

## I. Introduction

Les résultats prometteurs obtenus sur la lignée cellulaire JEG-3, ont motivé la réalisation d'une nouvelle étude sur des cellules issues de cultures primaires de cellules placentaires et plus particulièrement de cytotrophoblastes villos (CTV). Ces CTV ont été extraits à partir de placentas à terme issus d'une césarienne programmée. Ces cellules présentent l'avantage d'être représentatives des cellules placentaires, elles sont en revanche moins résistantes, plus difficile à cultiver et présentent une plus grande variabilité que les lignées cellulaires. Afin d'évaluer les perturbations potentielles du lipidome de ces cellules, celles-ci ont été incubées en présence et en absence de MEHP et une analyse lipidomique globale a été réalisée sur les culots cellulaires obtenus.

## II. Matériel et méthodes

L'analyse lipidomique a été réalisée par UPLC-MS selon la méthode mise au point et utilisée en routine au laboratoire (*cf* Analyse lipidomique globale dans les cellules JEG-3).

### A. Préparation des échantillons

Les cultures primaires de trophoblastes, issues de placentas à terme, ont été réalisées par le Dr Séverine Degrelle de l'UMR-S 1129.

L'analyse lipidomique a été effectuée sur des culots cellulaires incubés en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $n = 23$ ), à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $n = 23$ ) et en présence de DMSO ( $n = 23$ ), durant 48 h. Ces deux doses ont été retenues suite à des tests de cytotoxicité réalisés par le Dr Séverine Degrelle. L'extraction des lipides à partir des culots cellulaires a été réalisée selon le protocole déjà présenté précédemment lors de l'analyse lipidomique des cellules JEG-3.

### B. Analyse UPLC-MS

La procédure d'analyse des extraits lipidiques et les paramètres UPLC-MS utilisés sont les mêmes que ceux décrits lors de l'analyse lipidomique réalisée à partir des cellules JEG-3 et sont succinctement présentés ci-après. La séparation des lipides, fondée sur leur caractère hydrophobe, a été obtenue par RPLC (Acquity UPLC®, Waters, Manchester, UK), leur ionisation a été réalisée grâce à une source ESI en mode positif et négatif. Les ions ont ensuite été analysés dans un spectromètre de masse équipé d'un analyseur Q-TOF (Synapt® G2 High Definition MS™, Waters, Manchester, UK) utilisé en mode résolution (20 000 FWHM). Une solution de leucine enképhaline (Lock-Spray™) a été utilisée comme référence externe afin de compenser la dérive de mesure de l'analyseur.

### C. Design expérimental

Un contrôle qualité, noté QC 1/1, constitué par un mélange équivolumétrique de chaque extrait biologique, a été préparé. Des QCs 1/3 et 1/6 ont été également réalisés par dilution au tiers et au sixième de ce dernier. Comme pour l'analyse lipidomique des cellules JEG-3, des blancs analytiques et d'extraction, ainsi qu'un mélange de lipides standards ont été préparés. L'ordre d'injection a été défini pour être indépendant de la nature de ces derniers. Les contrôles qualités, blancs analytiques et d'extraction et mélange de lipides standards ont été analysés à plusieurs reprises à intervalle régulier.

### D. Prétraitement des données

Les étapes de prétraitement des données UPLC-MS obtenues sont semblables à celles utilisées lors de l'analyse lipidomique des cellules JEG-3. Des normalisations inter-échantillons par régression locale et intra-échantillon par transformation par le  $\log_{10}$ , centrage à la médiane et redimensionnement Pareto, ont été effectuées sur les données obtenues dans chaque mode d'ionisation. Seules les variables dont le CV est inférieur ou égale à 30 % et le coefficient de corrélation égal ou supérieur à 0,7 ont été retenues.

### E. Analyses statistiques multivariées

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SIMCA-P<sup>+</sup> 13.0.3 (Umetrics, Umea, Suède). Des approches non supervisées de type PCA et supervisées de type PLS-DA et OPLS-DA ont été utilisées afin de rechercher les variables discriminantes entre les groupes d'échantillons. Les modèles générés par PLS-DA ont été validés par un test de permutation (999 itérations) et par un test CV-ANOVA et les modèles générés par OPLS-DA par un test CV-ANOVA et par validation externe. Le modèle d'apprentissage a été généré sur 65 % des variables et les 35 % restants dans chaque groupe ont permis de tester le pouvoir prédictif du modèle.

Les variables dont la valeur absolue du  $p(\text{corr})$  et le score VIP sont égaux ou supérieur à 0,5 et 1, respectivement, ont été retenues. Un test univarié (Wilcoxon) combiné à une correction FDR a ensuite été appliqué sur chacune de ces variables.

### F. Annotation des variables

Les variables ont été annotées par interrogation de la base de données METLIN. Des différences respectives de 5 ppm et de 15 % ont été tolérées sur les valeurs de  $m/z$  et  $t_R$ .

## G. Courbe ROC

Une analyse par SVM a été réalisée à partir d'une matrice ne contenant que les lipides discriminants, en utilisant 80 % des échantillons pour l'apprentissage et les 20 % restants pour tester l'algorithme généré. Un rééchantillonnage automatique a été effectué autant de fois que possible (531 itérations) afin d'augmenter la fiabilité des résultats. La performance de l'algorithme a été évaluée par la construction graphique de courbes ROC dont l'AUC a été calculée.

## III. Résultats

### A. Prétraitement des données

Un encrassement de la source d'ionisation entraînant une diminution de l'intensité du signal au cours de l'analyse a été constatée à partir de l'injection répétée du QC 1/1 aussi bien en ESI+ qu'en ESI-. Une régression locale de type loess a été appliquée sur les données afin de corriger cette fluctuation (Figure 102, Figure 103).

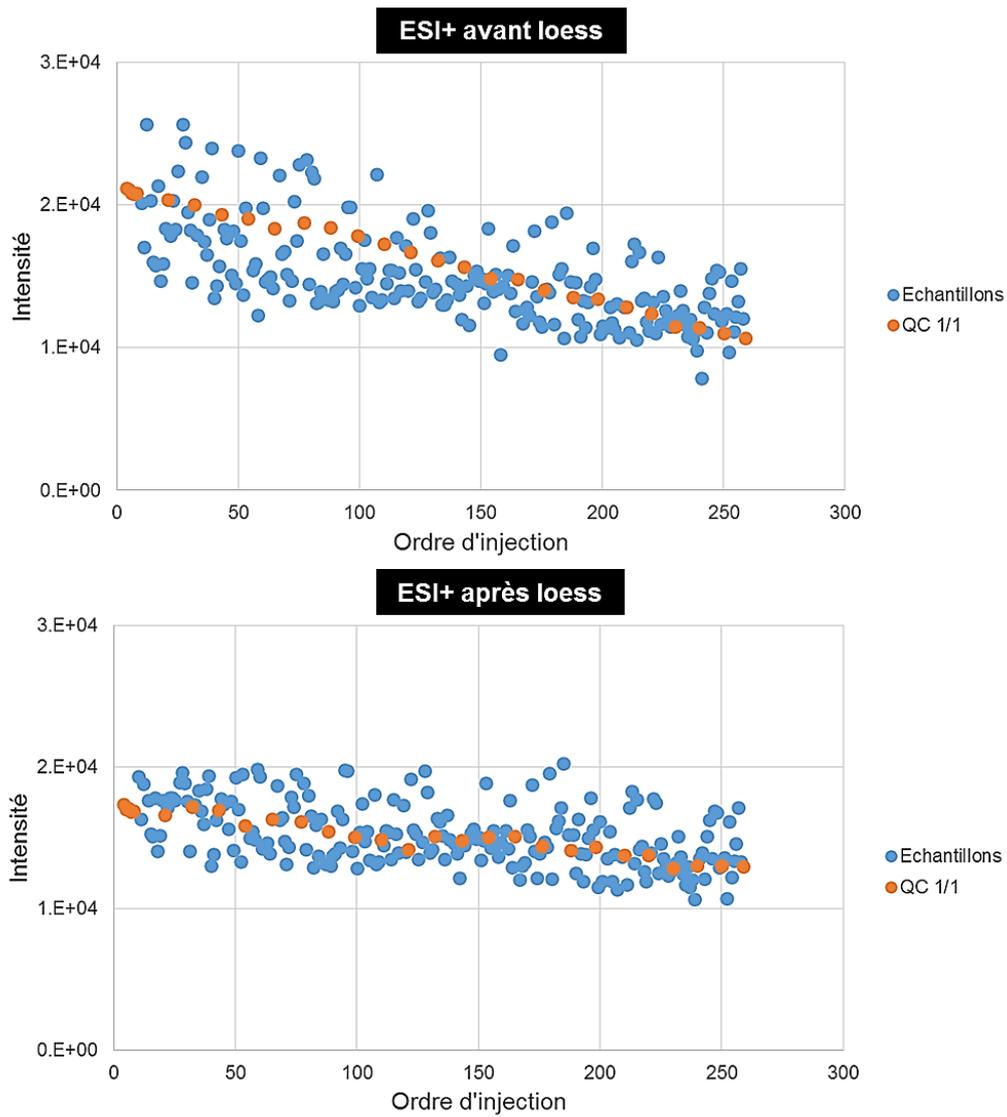


Figure 102 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection, en ESI+

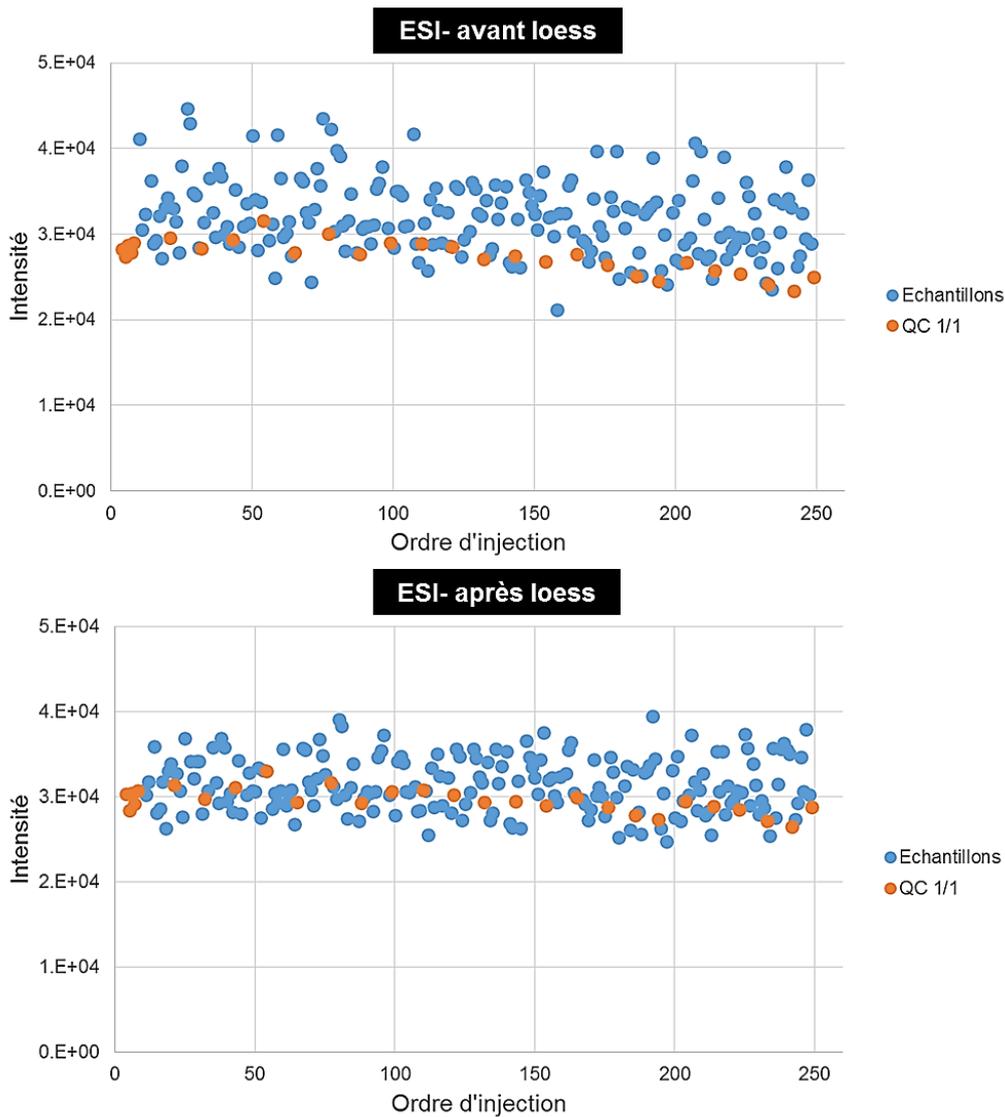


Figure 103 : Représentation de la somme des intensités des variables dans le QC 1/1 et dans les échantillons en fonction de l'ordre d'injection, en ESI-

### B. Analyses statistiques multivariées des trois groupes d'échantillons

Une analyse statistique non supervisée (PCA) a été menée sur l'ensemble des échantillons biologiques analysés (3 groupes), à partir des données obtenues dans les deux modes d'ionisation. Les *score plots* des deux modèles ternaires générés par PCA sont présentés ci-dessous (Figure 104).

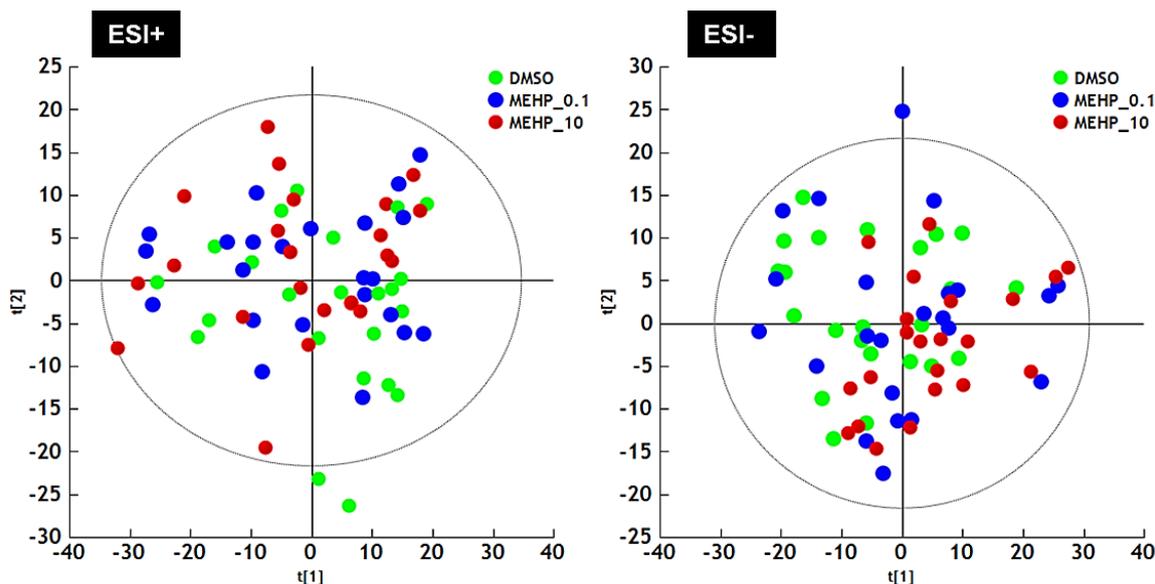


Figure 104 : *Score plots* des modèles ternaires construits en PCA, en ESI+ et ESI-  
 MEHP\_10 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 MEHP\_0,1 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 48 h ( $< 0,1 \%$  v/v)

Quel que soit le mode d'ionisation, aucune tendance de répartition des échantillons n'est observée. Les échantillons incubés en présence de MEHP ne peuvent être distingués des contrôles et aucun effet dose-réponse n'est visible. L'utilisation d'une approche non supervisée ne permet pas, dans ce cas, de construire des modèles suffisamment puissants pour expliquer et prédire la distribution des échantillons. Suivant une approche supervisée, deux nouveaux modèles ont été construits en PLS-DA, à partir des données obtenues dans les deux modes d'ionisation. Les représentations *score plots* de ces modèles montrent un début de séparation entre les trois groupes d'échantillons biologiques analysés (Figure 105). En ESI+ la séparation est plus nette et un effet dose-réponse est visible. En ESI-, une séparation marquée est visible entre le groupe d'échantillons biologiques issus de l'incubation en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et le groupe contrôle. En revanche, une dispersion importante des échantillons incubés en présence de MEHP à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  rend moins nette la séparation.

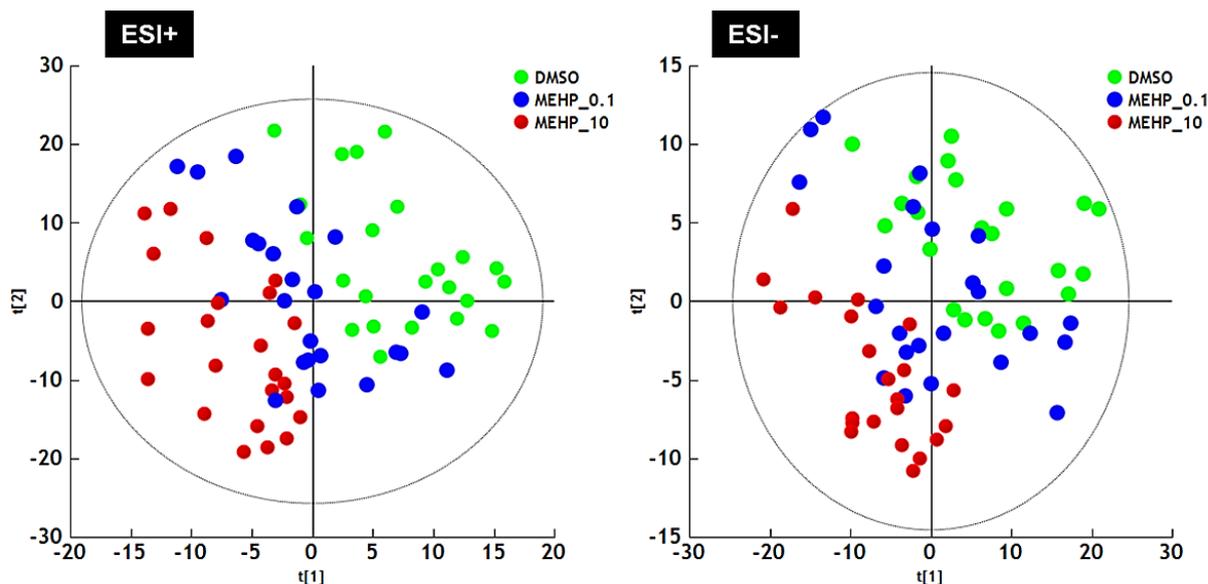


Figure 105 : *Score plots* des modèles ternaires générés en PLS-DA, en ESI+ et ESI-  
 MEHP\_10 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 MEHP\_0,1 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 48 h (< 0,1 % v/v)

Les paramètres qualités de ces modèles indiquent une capacité explicative et prédictive insuffisante de ces derniers ( $R^2X = 0,31$ ,  $R^2Y = 0,38$ ,  $Q^2 = 0,15$ ,  $p\text{-value} = 0,054$  en ESI+ et  $R^2X = 0,48$ ,  $R^2Y = 0,43$ ,  $Q^2 = 0,27$ ,  $p\text{-value} = 0,012$  en ESI-).

Les modèles ternaires générés en PLS-DA ne sont donc pas suffisamment performants pour différencier significativement les échantillons biologiques selon leur groupe d'appartenance, ces modèles ne sont donc pas validés. Des comparaisons deux à deux par de nouveaux modèles binaires ont donc été évaluées pour chacune des deux doses de MEHP.

## 1. MEHP à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ vs DMSO

### 1.1. *Analyses supervisées*

Un modèle PLS-DA comparant le groupe d'échantillons incubés en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  avec le groupe contrôle, incubé avec le DMSO, a été créé à partir des données collectées en UPLC-MS dans les deux modes d'ionisation. La représentation *score plot* des modèles générés montrent une nette séparation entre les deux groupes, à la fois en ESI+ et en ESI- (Figure 106).

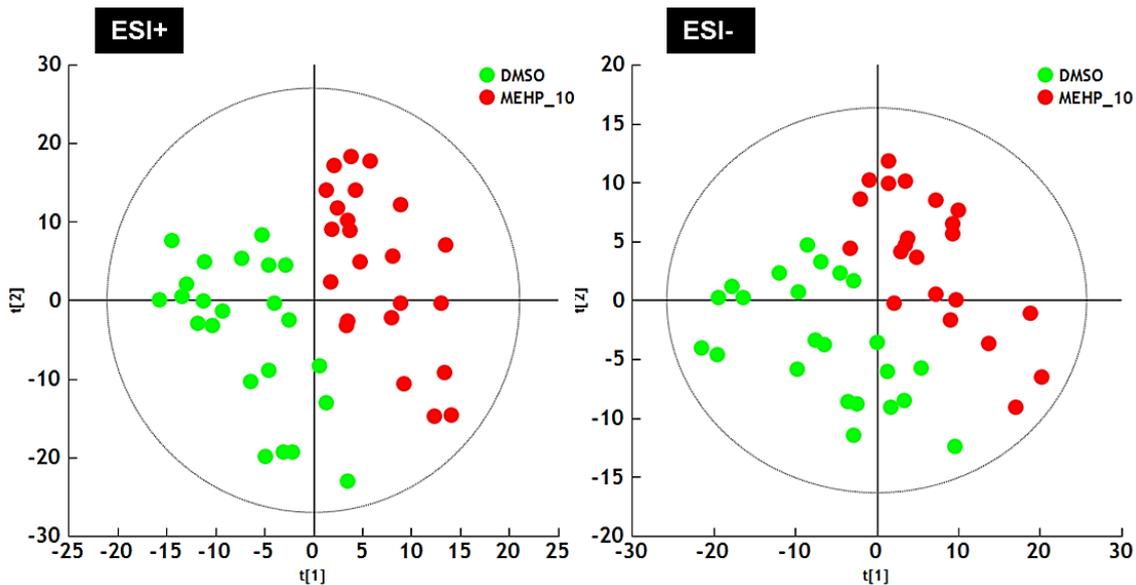


Figure 106 : *Score plots* des modèles binaires générés en PLS-DA, en ESI+ et ESI-  
 MEHP\_10 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 48 h ( $< 0,1 \%$  v/v)

À partir des données obtenues en ESI+, le modèle PLS-DA créé utilise 39 % ( $R^2X$ ) des variables pour expliquer 90 % ( $R^2Y$ ) et prédire 76 % ( $Q^2$ ) de la séparation. En ESI-, le modèle construit utilise 45 % des variables pour expliquer 91 % et prédire 77 % de la séparation. Les deux modèles présentent donc de très bons paramètres qualités. Le test de permutation (999 itérations) et le test CV-ANOVA ( $p\text{-value} = 10^{-9}$  en ESI+ et ESI-) valident ces deux modèles (Figure 107). Il existe donc une différence significative entre le groupe d'échantillons incubés en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et le groupe d'échantillons contrôles.

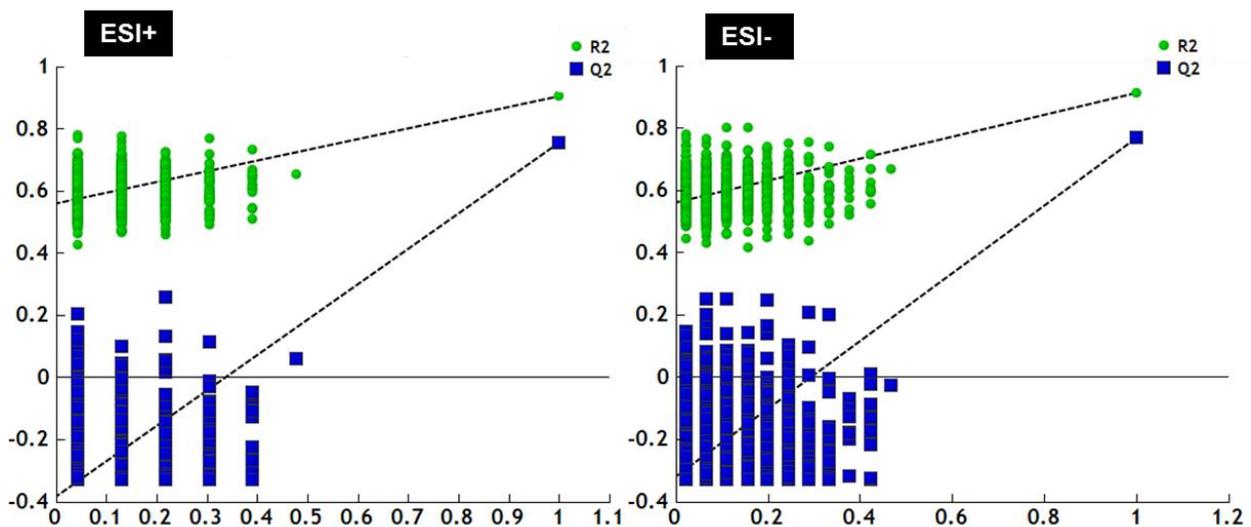


Figure 107 : Représentation des tests de permutation effectués en ESI+ et ESI- sur les modèles binaires créés par PLS-DA

Un modèle OPLS-DA a été créé à partir des données ESI+ et un autre à partir des données ESI- (Figure 108). Ils permettent une meilleure ségrégation de la composante explicative, responsable de la séparation MEHP/contrôle, de la composante non explicative, qui renvoie d'avantage à la variabilité intragroupe.

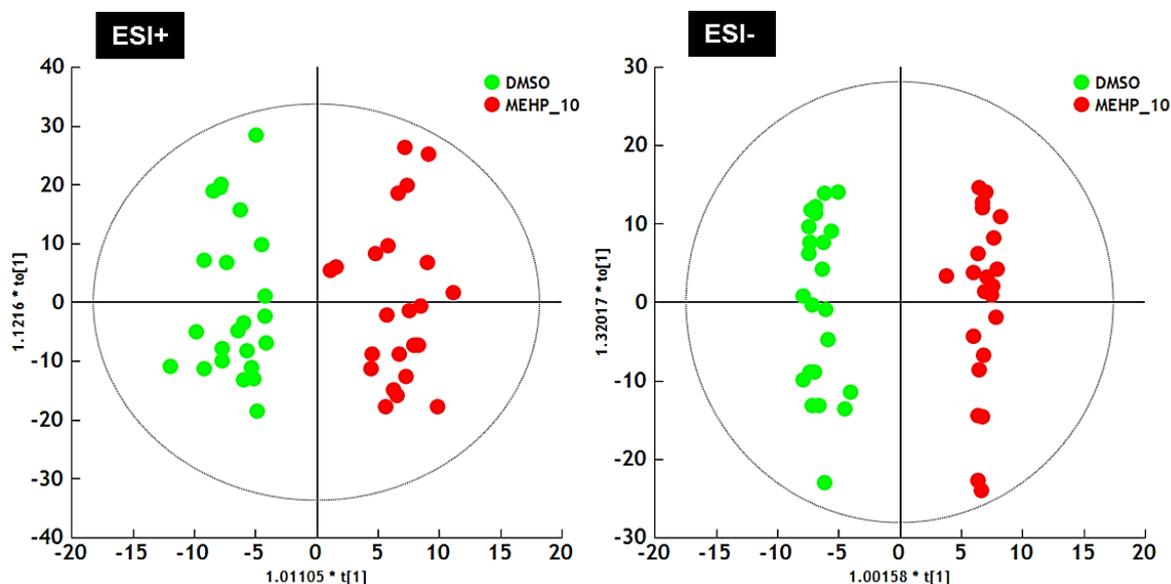


Figure 108 : Score plots des modèles binaires construits par OPLS-DA, en ESI+ et ESI-  
 MEHP\_10 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 48 h (< 0,1 % v/v)

Ces derniers présentent de très bonnes capacités explicatives et prédictives ( $R^2X = 0,39$ ,  $R^2Y = 0,90$ ,  $Q^2 = 0,78$ ,  $p\text{-value} = 10^{-11}$  en ESI+ et  $R^2X = 0,64$ ,  $R^2Y = 0,98$ ,  $Q^2 = 0,84$ ,  $p\text{-value} = 10^{-9}$  en ESI-). Une étape de validation externe a permis de confirmer le pouvoir prédictif de ces modèles puisqu'un taux de bonne classification de 100 % a été obtenu dans les deux modes d'ionisation (Tableau 32).

Tableau 32 : Tableau de contingence obtenu par validation externe en ESI+ et ESI-

	Nombre d'échantillons	Correct	Groupe MEHP	Groupe DMSO	Non classé
<b>Groupe MEHP_10</b>	8	100 %	8	0	0
<b>Groupe DMSO</b>	8	100 %	0	8	0
<b>Non classé</b>	0		0	0	0
<b>Total</b>	16	100 %	8	8	0
<b>p-value (Fisher)</b>	0,004				

Groupe MEHP\_10 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 Groupe DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 48 h  
 (< 0,1 % v/v)

L'étape d'apprentissage a été réalisée sur 65 % des échantillons (n = 15) et l'étape de test sur les 35 % restants (n = 8)

Les modèles binaires générés par OPLS-DA, sur les données recueillies en ESI+ et en ESI-, sont donc suffisamment puissants pour parvenir à prédire systématiquement l'appartenance de groupe des échantillons. La représentation *S-plot* de ces modèles a ensuite permis de rechercher les variables discriminantes à l'origine de la séparation de groupes (Figure 109).

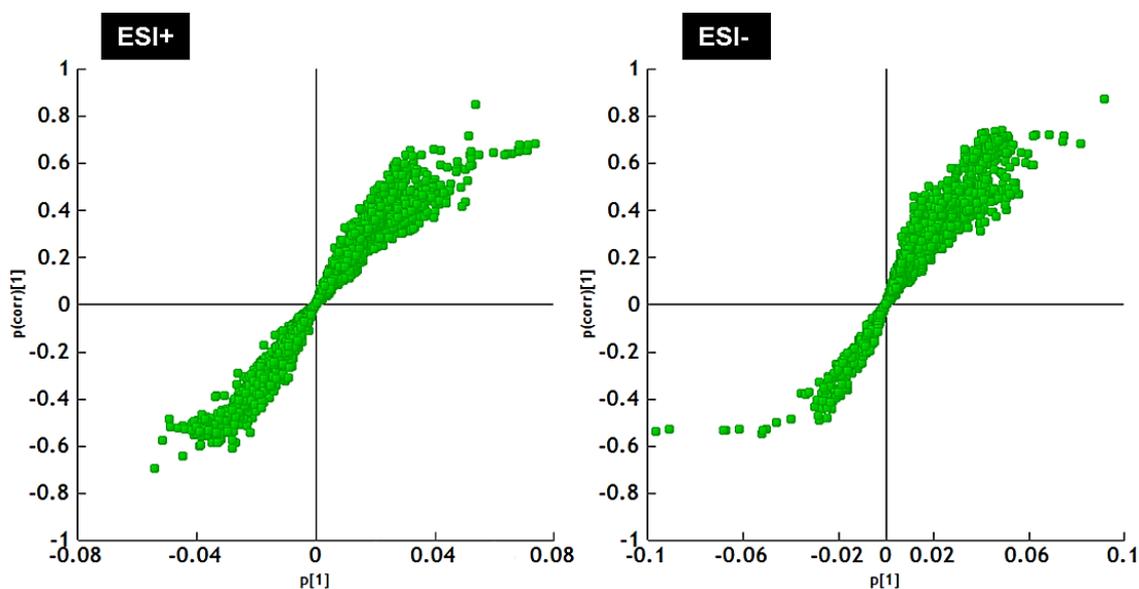


Figure 109 : *S-plots* des modèles binaires construits en OPLS-DA, en ESI+ et ESI-

En ESI+, 284 variables ont été sélectionnées selon les critères des valeurs de  $p(\text{corr})$  et score VIP, pour 151 en ESI-. Un test de Wilcoxon avec une correction FDR a finalement permis de retenir 239 variables en ESI+ et 118 en ESI- significativement ( $p\text{-value} < 0,05$ ) différentes par leur intensité entre les groupes d'échantillons.

## 1.2. Annotation des variables

Sur les 239 variables retenues en ESI+, 90 ont été annotées comme lipide, pour 73 en ESI-. Après vérification des temps de rétention, élimination des variables redondantes et élimination des isotopes de masse, un total de 115 lipides a été annoté (Tableau 33).

Tableau 33 : Annotation et régulation des lipides discriminants entre les cellules trophoblastiques incubées en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  et les cellules contrôles

Classes de lipides	Nombre d'espèces	MEHP vs Contrôles	
		Augmentés	Diminués
AGs	24	+53%	
MGs	1	+40%	
DGs	13	+33%	
PEs	3 LPE	+28%	
	9 PE	+15% (8)	-37% (1)
	1 PE-P		-22%
	1 LPC		-35%
PCs	10 PC	+13% (5)	-31% (5)
	2 PC-P		-32%
	1 LPG	+102%	
PGs	10 PG	+34% (3)	-34% (7)
	1 PG-P	+42%	
PSs	19 PS	+8% (5)	-38% (14)
	13 PS-P	+24% (5)	-40% (8)
	3 LPA	+19% (2)	-15% (1)
PAs	1 PA		-19%
	3 PA-P	+19%	

Augmentés : lipides dont le taux est augmenté dans les cellules incubées en présence de MEHP  
 Diminués : lipides dont le taux est diminué dans les cellules incubées en présence de MEHP  
 AGs : acides gras, DGs : diacylglycérols, MGs : monoacylglycérols, PEs : phosphatidyléthanolamines,  
 PCs : phosphatidylcholines, PGs : phosphatidylglycérols, PSs : phosphatidylsérines, PAs : glycérophosphates  
 PE-P : PE plasmalogènes, LPE : Lyso PEs, PC-P : PC plasmalogènes,  
 LPCs : Lyso PCs, PG-P : PG plasmalogènes, LPG : Lyso PGs, PS-P : PS plasmalogènes,  
 PA-P : PA plasmalogènes, LPA : Lyso PAs

Les résultats pour chacun des 115 lipides annotés sont présentés en Annexe 6.

Parmi les lipides discriminants annotés, les classes des acides gras et des phosphatidylsérines sont les plus représentées. Les AGs voient leur taux significativement augmenté en moyenne de 53 % dans les cellules incubées en présence du phtalate. De même, le taux des DGs et des MGs annotés est augmenté respectivement en moyenne de 40 % et de 33 % dans ces cellules. Les taux des autres lipides, appartenant à la classe des glycérophospholipides, sont pour certains augmentés et pour les autres diminués.

### 1.3. Courbe ROC

Les courbes ROC générées par SVM à partir d'un algorithme utilisant 531 itérations présentent une AUC moyenne de  $0,99 \pm 0,02$ , soit un taux de vrais positifs de 99 %.

L'ensemble des lipides annotés présente donc un excellent pouvoir prédictif puisque dans 99 % des cas en moyenne, ils permettent de classer correctement des échantillons inconnus.

## 2. MEHP à 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ vs DMSO

### 2.1. Analyses supervisées

À partir des échantillons incubés en présence de MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  d'une part et de DMSO d'autre part (contrôles), deux modèles ont été construits en PLS-DA. La représentation *score plot* de ces modèles montre une séparation assez nette entre les deux groupes d'échantillons, dans les deux modes d'ionisation (Figure 110).

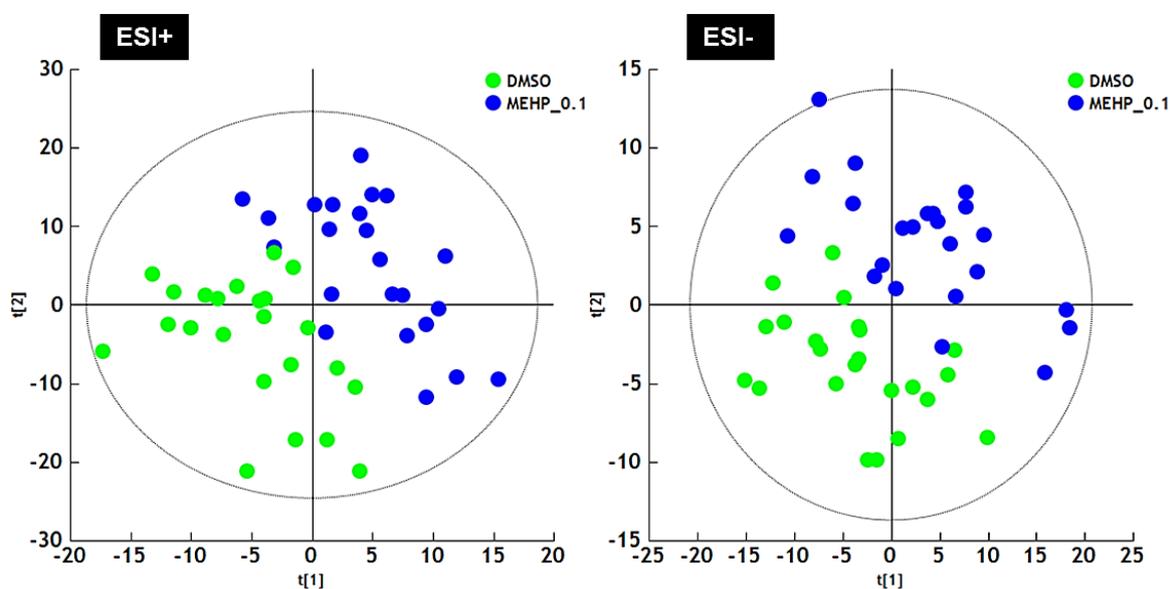


Figure 110 : *Score plots* des modèles binaires générés en PLS-DA, en ESI+ et ESI-  
MEHP\_0,1 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 48 h (< 0,1 % v/v)

En ESI+, le modèle utilise 40 % ( $R^2X$ ) des variables pour expliquer 89 % ( $R^2Y$ ) et prédire 65 % ( $Q^2$ ) de la séparation. Ce modèle présente donc de bons paramètres qualités. À partir des données obtenues en ESI-, les paramètres du modèle généré indiquent que celui-ci utilise 34 % des variables pour expliquer 74 % et prédire 45 % de la séparation. La capacité prédictive du modèle ESI- est acceptable, le modèle étant validé par le test de permutation (Figure 111) et le test CV-ANOVA ( $p\text{-value} = 10^{-6}$  en ESI+ et  $10^{-4}$  en ESI-).

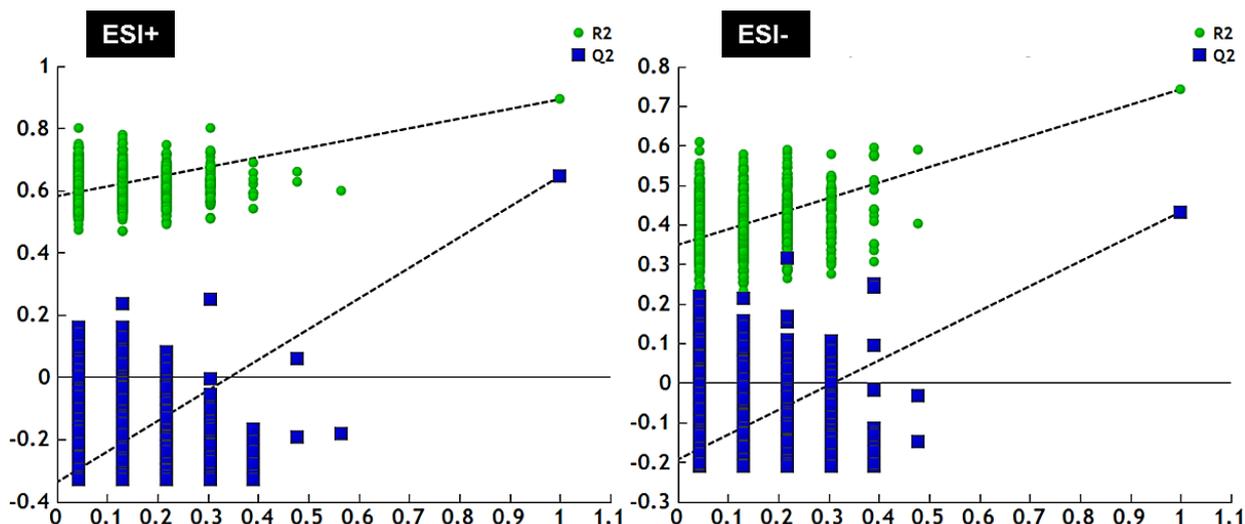


Figure 111 : Représentation des tests de permutation effectués en ESI+ et ESI- sur les modèles binaires construits par PLS-DA

Deux modèles OPLS-DA ont, comme dans le cas de la comparaison MEHP  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ /contrôle, été créés à des fins identiques (Figure 112).

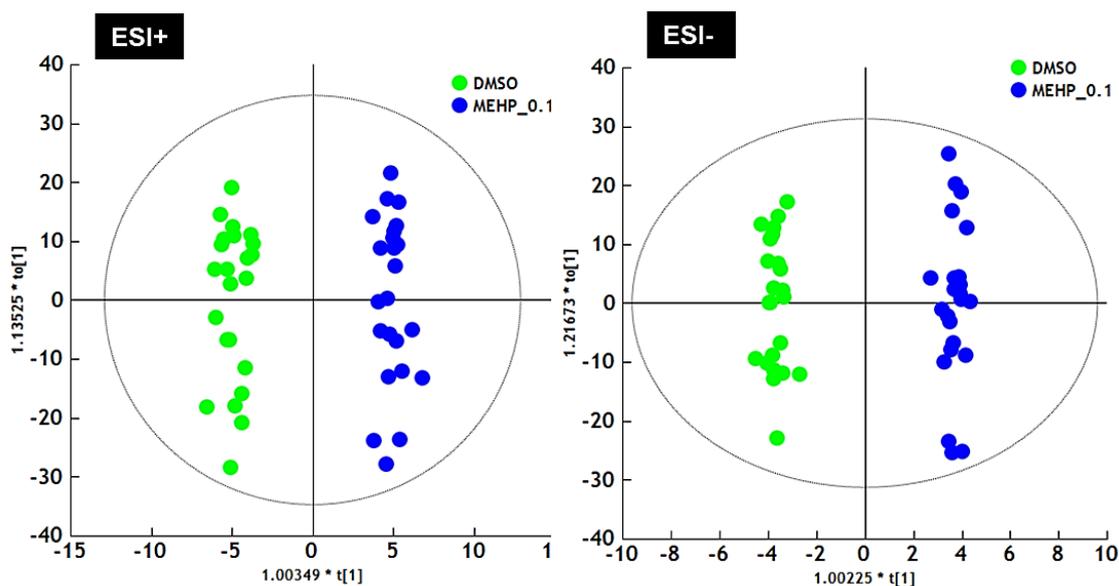


Figure 112 : Score plots des modèles binaires construits en OPLS-DA, en ESI+ et ESI-  
 MEHP\_0,1 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 48 h ( $< 0,1 \%$  v/v)

Ces modèles présentent de bonnes capacités explicatives et prédictives ( $R^2X = 0,56$ ,  $R^2Y = 0,98$ ,  $Q^2 = 0,75$ ,  $p\text{-value} = 10^{-7}$  en ESI+ et  $R^2X = 0,71$ ,  $R^2Y = 0,99$ ,  $Q^2 = 0,63$ ,  $p\text{-value} = 10^{-5}$  en ESI-). Une validation externe a confirmé le pouvoir prédictif de ces deux modèles puisqu'un taux de bonne classification de 100 % a été obtenu dans les deux modes d'ionisation (Tableau 34).

Tableau 34 : Tableau de contingence obtenu par validation externe en ESI+ et ESI-

	Nombre d'échantillons	Correct	Groupe MEHP	Groupe DMSO	Non classé
Groupe MEHP_0,1	8	100 %	8	0	0
Groupe DMSO	8	100 %	0	8	0
Non classé	0		0	0	0
<b>Total</b>	16	100 %	8	8	0
<b>p-value (Fisher)</b>	0,004				

Groupe MEHP\_0,1 : groupe correspondant aux cellules incubées avec le MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h,  
 Groupe DMSO : groupe correspondant aux cellules contrôles incubées en présence de DMSO durant 48 h  
 (< 0,1 % v/v)

L'étape d'apprentissage a été réalisée sur 65 % des échantillons (n = 15) et l'étape de test sur les 35 % restants (n = 8)

Comme dans les cas précédents, la représentation *S-plot* des modèles construits en OPLS-DA a permis de rechercher les variables responsables de la discrimination MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ /contrôles (Figure 113).

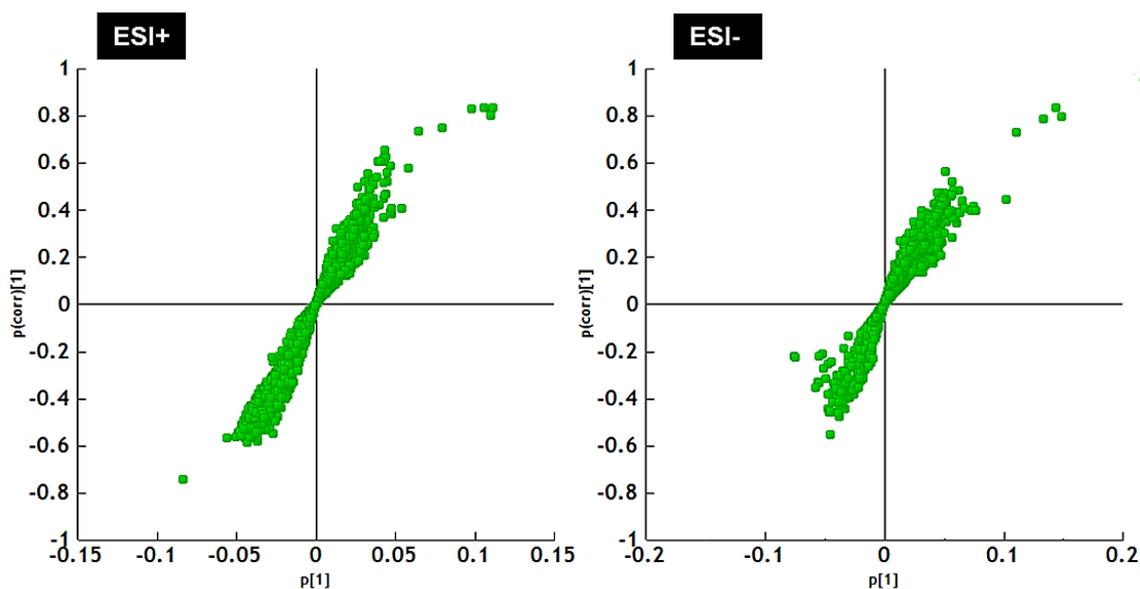


Figure 113 : *S-plots* des modèles binaires générés en OPLS-DA, en ESI+ et ESI-

En ESI+, 103 variables ont été retenues selon les critères des valeurs de  $p(\text{corr})$  et score VIP, pour 15 en ESI-. À la suite du test de Wilcoxon et de la correction FDR, 98 (ESI+) et 12 (ESI-) variables diffèrent significativement ( $p\text{-value} < 0,05$ ) par leur intensité entre les groupes d'échantillons.

## 2.2. Annotation des variables

Sur les 98 variables retenues en ESI+, 52 ont été annotées comme lipide, pour 5 en ESI-. Après vérification des temps de rétention, élimination des variables redondantes et élimination des isotopes de masse, 50 lipides ont été annotés au total (Tableau 35).

Tableau 35 : Annotation et régulation des lipides discriminants entre les cellules trophoblastiques incubées en présence de MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  et les cellules contrôles

Classes de lipides	Nombre d'espèces	MEHP vs Contrôles	
		Augmentés	Diminués
AGs	3	+10%	
MGs	2	+19%	
DGs	10	+19%	
PCs	1 LPC		-27%
	11 PC	+11% (4)	-23% (7)
	2 PC-P	+7%	
	3 LPE	+41%	
PEs	1 PE	+7%	
	1 PE-P	+7%	
PGs	3 PG	+11% (1)	-8% (2)
	4 PG-P	+15%	
PSs	4 PS		-19%
	5 PS-P		-21%

Augmentés : lipides dont le taux est augmenté dans les cellules incubées en présence de MEHP

Diminués : lipides dont le taux est diminué dans les cellules incubées en présence de MEHP

AGs : acides gras, DGs : diacylglycérols, MGs : monoacylglycérols, PEs : phosphatidyléthanolamines, PCs : phosphatidylcholines, PGs : phosphatidylglycérols, PSs : phosphatidylsérines, PE-P : PE plasmalogènes, LPE : Lyso PEs, PC-P : PC plasmalogènes, LPCs : Lyso PCs, PG-P : PG plasmalogènes, PS-P : PS plasmalogènes,

Les résultats détaillés pour chacun des 50 lipides annotés sont présentés en Annexe 7.

Les lipides discriminants annotés, appartiennent pour la plupart aux sous-classes des DGs et des PCs. Le taux des DGs annotés est en moyenne augmenté de 19 % dans les cellules incubées en présence du phtalate, tandis que celui des PCs est augmenté de 11 % pour quatre espèces alors qu'il est diminué de 23 % pour sept autres. Le taux et en moyenne augmenté de 10 % et 19 % pour les espèces lipidiques annotées appartenant aux classes des AGs et des MGs chez les cellules incubées en présence de MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Les PEs, LPEs et PEs-P annotés sont toutes augmentées dans les cellules incubées avec le MEHP, tandis que toutes les PSs sont diminuées dans ces cellules.

### 2.3. Courbe ROC

L'AUC moyenne issue de la représentation des courbes ROC de l'algorithme généré (531 itérations) par SVM est de  $0,79 \pm 0,13$ , correspondant à un taux de vrais positifs de 79 % (Figure 114).

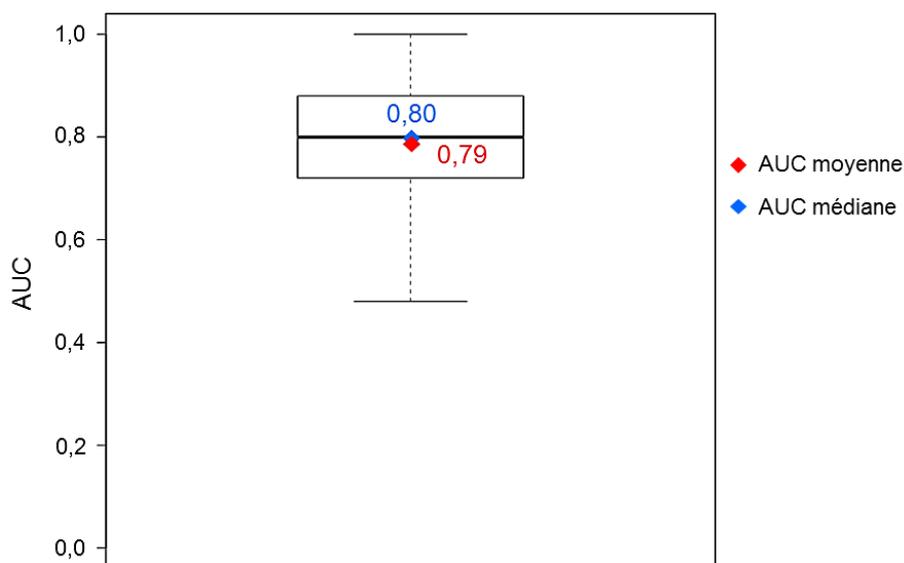


Figure 114 : Boxplots des valeurs d'AUC moyennes et médianes pour l'ensemble des lipides annotés

L'ensemble des lipides annotés présente donc un bon pouvoir prédictif puisque l'algorithme permet de classer correctement des échantillons inconnus dans 79 % des cas, en moyenne.

## IV. Discussion

L'étude lipidomique menée sur les cellules issues de cultures primaires de trophoblastes a permis de mettre en évidence une perturbation importante du lipidome de ces cellules suite à une incubation en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . L'obtention de 23 culots cellulaires par condition d'incubation, offre un pouvoir statistique suffisamment puissant permettant de réduire la variabilité non désirée au profit de celle due aux conditions d'incubation.

### A. Comparaison entre les deux doses d'incubation

Les résultats de l'analyse lipidomique ont montré que, quelle que soit la dose de MEHP utilisée lors de l'incubation, une dérégulation du taux de certaines classes de lipides est observée. Les classes concernées sont les glycérolipides, les acides gras et les

glycérophospholipides. Ces classes sont les mêmes quelle que soit la dose utilisée. En effet, toutes les classes et sous-classes de lipides considérés discriminants à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  sont également retrouvées à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , et les tendances de régulations de ces lipides sont comparables. Aux deux doses utilisées, les AGs voient leur taux augmenté dans les cellules incubées en présence de MEHP, tout comme les DGs, les MGs, les LPEs, et les PGs-P. À l'inverse les LPCs sont diminués après incubation en présence du phtalate. La régulation des PCs et des PGs n'est pas homogène mais reste similaire dans les deux cas. Les seules différences observées entre les deux doses d'incubation concernent le taux de PEs, PEs-P, PCs et PSs et peuvent potentiellement être expliquées par le nombre peu élevé d'espèces retrouvées dans les cellules incubées à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Parmi les espèces lipidiques dont le taux est modifié après incubation au MEHP, 19 d'entre elles sont communes aux deux doses utilisées,  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figure 115).

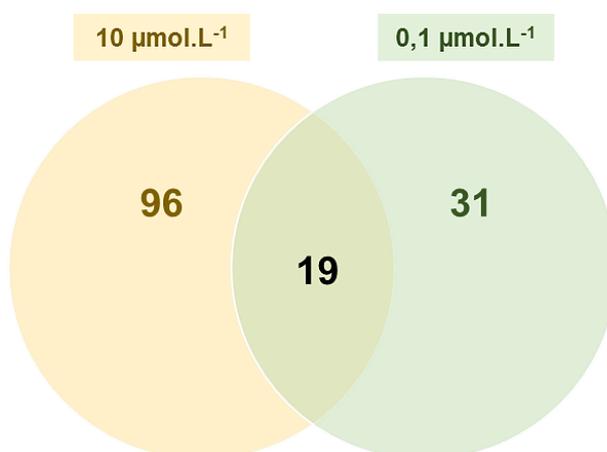


Figure 115 : Diagramme de Venn montrant la répartition des lipides discriminants entre les deux groupes d'échantillons incubés en présence de MEHP

La majorité d'entre elles appartient à la sous-classe des DGs (42 %) et des PSs (31 %). À l'exception d'un PC et de deux PSs, tous les lipides communs voient leur taux beaucoup plus élevé à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  qu'à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Tableau 36). Pour ces espèces, il semble donc que l'effet du MEHP soit dose dépendant.

Tableau 36 : Régulation des espèces lipidiques communes entre les deux doses d'incubation

Lipides	Régulation MEHP vs Contrôle	
	MEHP 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	MEHP 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
<i>Diacylglycérols</i>		
DG(36:2)	+21%	+42%
DG(36:3)	+25%	+37%
DG(36:4)	+18%	+32%
DG(36:5)	+13%	+38%
DG(38:6)	+25%	+36%
DG(40:7)	+19%	+24%
DG(40:8)	+16%	+25%
DG(42:10)	+19%	+24%
<i>Acides gras</i>		
AG(24:4)	+10%	+95%
<i>Phosphatidyléthanolamines</i>		
LPE(18:1)	+9%	+20%
<i>Phosphatidylglycérols</i>		
PG-P(40:6)	+19%	+42%
<i>Phosphatidylcholines</i>		
PC(30:1)	+13%	-30%
PC(42:10)	-23%	-33%
<i>Phosphatidylsérines</i>		
PS(40:2)	-27%	-41%
PS(38:3)	-10%	+32%
PS-P(34:2)	-13%	-39%
PS-P(38:4)	-8%	+42%
PS-P(40:3)	-27%	-41%
PS-P(42:1)	-23%	-44%

Cependant, un plus grand nombre de variables a été annoté à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  puisque 115 lipides ont été considérés discriminants, contre 50 à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . L'effet du MEHP sur le lipidome des cellules trophoblastiques semble donc être qualitativement très proche pour les deux doses alors qu'il est, pour certains lipides, quantitativement différent puisqu'il existe un effet dose-réponse. Une étude réalisée par le Dr Séverine Degrelle a montré que le MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  induit une augmentation de l'activité de PPAR $\gamma$  tandis qu'à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  l'effet inverse est observé. À 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , une accumulation d'AGs est constatée et le taux moyen d'augmentation est de 53 %. Il faut rappeler que ces AGs peuvent également être des ligands agonistes de PPAR $\gamma$ . En revanche, à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  seules trois espèces d'AGs voient leur taux augmenté de seulement 10 %, donc de façon moins marquée qu'à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Les résultats obtenus par l'analyse lipidomique semblent donc concorder avec ceux obtenus par le Dr Séverine Degrelle. Parmi les AGs annotés, l'acide arachidonique voit son taux augmenté de 98 % dans les cellules trophoblastiques incubées à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MEHP. Ce résultat suggère donc une possible perturbation du métabolisme des eicosanoïdes dans ces cellules.

Une étude plus ciblée sur cette famille de lipides pourrait donc être envisagée, suivant la méthode développée précédemment (*cf* Analyse des eicosanoïdes dans les cellules JEG-3).

Certains des lipides dont le taux est significativement modifié après incubation des cellules en présence de MEHP à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  appartiennent aux classes des glycérolipides et des glycérophospholipides. Le rôle de PPAR $\gamma$  dans la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme de ces différentes classes de lipides a déjà été décrit dans la partie sur les cellules JEG-3. Parmi les glycérolipides, tous les MGs et DGs annotés ont un taux augmenté dans les cellules incubées en présence de MEHP. Il est à noter que l'incubation en présence de MEHP ne modifie aucun lipide de la classe des TGs quelle que soit la dose à laquelle est utilisé le phtalate. Ce résultat peut sembler surprenant puisque la biosynthèse des DGs et des MGs est très étroitement reliée à celle des TGs. Nos résultats semblent indiquer que la présence de MEHP n'a pas d'impact sur la voie de synthèse des TGs.

## B. Comparaison entre la culture primaire et la lignée cellulaire

À l'instar des résultats obtenus sur la lignée cellulaire JEG-3, l'analyse lipidomique effectuée sur des culots cellulaires issus de cultures primaires de trophoblastes a donc mis en évidence une perturbation importante du lipidome de ces cellules, suite à une incubation en présence de MEHP. Cette dérégulation qui est observée aussi bien à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  qu'à  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MEHP, est cependant moins marquée lorsque la dose la plus faible est utilisée. L'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP semble donc entraîner une perturbation du métabolisme lipidique dans les deux modèles cellulaires placentaires. Cependant, si l'on compare les lipides concernés, des résultats très différents sont obtenus pour certains lipides, d'un type de cellules à l'autre. En effet, alors que dans le cas des cellules JEG-3, certains TGs sont augmentés de 79 % en moyenne, aucun changement n'est observé pour ces lipides à partir des cultures primaires. Certains MGs et DGs voient leur taux significativement diminué dans les cellules JEG-3 alors que le résultat inverse est observé avec les cultures primaires. Concernant les glycérophospholipides, certains ont une régulation similaire entre les deux modèles, c'est le cas des PEs-P, des PEs et des PCs-P, tandis que d'autres ont des tendances de régulation différentes. Des espèces appartenant aux familles des PSs et des PAs ont leur taux modifié après incubation en présence de MEHP mais uniquement dans le cas des cultures primaires de trophoblastes. Enfin, chez les deux modèles cellulaires, une accumulation importante d'AGs a pu être observée. Cependant, les espèces diffèrent entre les deux modèles. Effectivement, chez les cellules JEG-3, les AGs dont le taux est modifié sont majoritairement des espèces en C13, C16 et C20, alors que chez les cultures primaires il s'agit d'espèces en C16, C20, C22 et C24, qui contiennent donc des AGs à plus longues chaînes. De plus, aucun précurseur des eicosanoïdes ne voit son taux modifié lorsque l'on considère les cellules JEG-3

après incubation avec le MEHP. En revanche, l'acide arachidonique (C20:4) et l'acide eicosapentaénoïque (C20:5) sont augmentés de 98 % et 76 %, respectivement, chez les cultures primaires après incubation en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . L'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP semble donc induire une dérégulation du métabolisme lipidique dans les deux modèles cellulaires étudiés qui se traduit notamment par une accumulation d'acides gras. L'implication de PPAR $\gamma$  dans le transport, le stockage et l'oxydation des acides gras semble donc être confirmée à la fois chez les cellules JEG-3 et les cultures primaires de trophoblastes. Néanmoins, il semble que de la lignée cellulaire à la culture primaire, les voies métaboliques perturbées sont différentes. De fait, la question peut se poser quant au choix du modèle cellulaire à adopter. En effet, la lignée cellulaire représente, pour notre étude, un bon modèle afin de visualiser un effet global du MEHP mais ne permet pas l'étude d'effets spécifiques sur les espèces lipidiques. En revanche, les cellules issues de cultures primaires de trophoblastes sont, quant à elles, plus adaptées afin de déterminer l'impact réel du MEHP sur le lipidome des cellules placentaires.

## V. Conclusion

La méthode UPLC-MS mise au point au laboratoire a permis de mettre en évidence une perturbation importante du lipidome des cellules trophoblastiques suite à une incubation en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  mais également à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h. Les modèles statistiques créés à partir des trois groupes d'échantillons n'ont pas montré une puissance suffisante pour différencier significativement les échantillons selon leur groupe d'appartenance. De fait, des modèles binaires ont été générés afin de déceler les variables discriminantes et d'évaluer leur pouvoir prédictif. Quelle que soit la dose d'incubation, les lipides discriminants appartiennent aux mêmes classes de lipides, c'est-à-dire aux acides gras, aux glycérolipides et aux glycérophospholipides. Cependant, une perturbation plus marquée est observée à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , avec un plus grand nombre de lipides annotés et des taux de régulation plus élevés. Un effet dose-réponse semble donc être présent. Ces résultats sont concordants avec l'étude effectuée par nos partenaires de l'UMR-S 1129 montrant un effet dose sur l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP.

Parmi les lipides annotés à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , l'acide arachidonique ainsi que l'acide eicosapentaénoïque, précurseurs des eicosanoïdes, ont un taux significativement augmenté dans les cellules. Une analyse plus spécifique sur la classe des acides gras et notamment des eicosanoïdes paraît donc pertinente. En effet, une accumulation de ces derniers dans les cellules placentaires représente une source considérable de ligands pour PPAR $\gamma$ , pouvant donc entraîner une activation accrue de ce dernier et ainsi avoir des conséquences non négligeables sur le développement du placenta et sur le développement fœtal <sup>372,373</sup>. En

particulier, une augmentation du taux d'acides gras libres dans le tissu placentaire semble être associée à un risque accru de prééclampsie <sup>59</sup>. Le MEHP semble donc représenter un facteur de risque dans la survenue de grossesses prééclamptiques.

## **Conclusion générale**



Le placenta est un organe indispensable au développement et à la croissance du fœtus. Toute dérégulation impactant son développement peut donc avoir de graves répercussions sur le déroulement de la grossesse. La formation du placenta est caractérisée par la différenciation des cellules trophoblastiques, en syncytiotrophoblastes et cytotrophoblastes villosités, durant le premier trimestre. Différentes études ont mis en évidence le rôle primordial du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  dans la formation du syncytium ainsi que dans l'invasion trophoblastique. L'activation de PPAR $\gamma$ , par des ligands spécifiques, régule donc étroitement le développement précoce du placenta. D'autres études ont également mis en avant le rôle important de PPAR $\gamma$  dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique placentaire. De fait, toute modulation non physiologique de l'activité de PPAR $\gamma$  pourrait entraîner des perturbations du métabolisme lipidique et, de fait, avoir des conséquences sur le développement du placenta et du fœtus. PPAR $\gamma$  est activé par de nombreux ligands endogènes, appartenant notamment à la famille des eicosanoïdes. Cependant, ce dernier est également activé par des ligands exogènes tels que le MEHP, phtalate classé toxique pour la reproduction et perturbateur endocrinien. Ainsi, notre étude a été fondée sur l'hypothèse selon laquelle l'activation de PPAR $\gamma$  par le MEHP pourrait engendrer une perturbation du profil lipidique des cellules placentaires. Afin d'explorer cette hypothèse, différentes analyses du lipidome de cellules placentaires ont été réalisées à partir de deux modèles cellulaires : une lignée cellulaire et une culture primaire de trophoblastes.

Les résultats obtenus par l'analyse lipidomique globale effectuée à partir de la lignée cellulaire JEG-3 ont montré que l'incubation de ces cellules pendant 72 h en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , induit une perturbation importante du lipidome. Cette dérégulation concerne notamment les classes des glycérolipides, des glycérophospholipides et des sphingolipides. En particulier, une augmentation moyenne significative de 79 % du taux de triacylglycérols a été constatée dans ces cellules. Sur la base des résultats obtenus lors de l'analyse lipidomique précédente, une étude transcriptomique ciblant les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les voies métaboliques probablement perturbées par le MEHP a été effectuée. Les résultats ont montré une perturbation de l'expression de certains gènes, c'est en particulier le cas de celui codant pour la DGAT, enzyme essentielle à la biosynthèse des TGs, dont l'expression est augmentée dans les cellules JEG-3 incubées en présence de MEHP. Ce résultat corrobore donc celui obtenu en lipidomique. La voie de métabolisation des TGs par les cellules JEG-3 semble donc être directement perturbée par le MEHP. Des études ciblant plus particulièrement les classes des acides gras et de certains stérols ont également été menées et ont montré une accumulation importante d'acides gras libres et de leurs dérivés oxydés dans ces cellules. Ces résultats sont en accord avec le rôle connu de PPAR $\gamma$  dans la régulation du métabolisme des acides gras et notamment dans leur stockage. En revanche, le

métabolisme du cholestérol et des oxystérols ne semble pas être influencé par la présence du phtalate. L'ensemble des résultats obtenus tend donc à confirmer notre hypothèse de départ, néanmoins, l'utilisation d'un modèle d'étude de lignée cellulaire cancéreuse limite les conclusions pouvant en être tirées pour le placenta lui-même. Un modèle cellulaire plus représentatif du placenta a donc été utilisé par la suite et, à cette fin, une analyse lipidomique a été effectuée sur des cellules issues de cultures primaires de trophoblastes, incubées en présence de MEHP aux doses de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Comme dans le cas des cellules JEG-3, les résultats obtenus montrent une perturbation marquée du lipidome des cellules issues de cultures primaires de trophoblastes. En revanche, les espèces dont le taux est modifié ne sont pas toujours les mêmes et, lorsqu'il s'agit d'espèces différentes mais appartenant à la même classe, le taux peut être inchangé ou modifié de façon opposée. Ainsi, tandis que le taux de certains TGs est significativement augmenté lorsque l'on considère la lignée cellulaire, celui-ci reste stable chez les cultures primaires. De même, le taux de certains DGs et MGs est diminué chez les cellules JEG-3 alors que le résultat inverse est observé à partir des cultures primaires. Le choix du modèle cellulaire d'étude est donc primordial selon les applications désirées. Le lipidome des cellules trophoblastiques étant fortement perturbé par la présence de MEHP, des études complémentaires, notamment des mesures d'activité enzymatique, seraient pertinentes afin de rechercher les voies de métabolisation perturbées par ce contaminant chimique. De plus, un effet dose dépendant a été mis en évidence et a également été observé par le Dr Séverine Degrelle à partir de mesures d'activité de PPAR $\gamma$ . En effet, l'activité de PPAR $\gamma$  croît avec la concentration en MEHP utilisée lors de l'incubation.

La méthode d'analyse lipidomique mise au point utilisée en routine au laboratoire a donc permis de révéler des changements au niveau du lipidome des cellules incubées en présence de MEHP. Bien que l'on puisse considérer la méthode utilisée comme globale, certaines classes de lipides ne sont pas analysées. En effet, les eicosanoïdes, les stérols et oxystérols, les saccharolipides (glycosphingolipides et gangliosides) et les polycétides ne sont pas analysés par cette méthode. Le développement de méthodes spécifiques à ces lipides serait donc nécessaire.

La démarche utilisée lors des analyses lipidomiques effectuées dans notre étude est fondée sur une annotation des variables selon la valeur  $m/z$  et  $t_R$ . Dans le cadre des travaux réalisés dans ce projet de thèse, l'objectif a été d'évaluer une perturbation globale du lipidome des cellules placentaires et, de fait, l'annotation des lipides a semblé suffisante. Cette annotation a permis de déterminer la classe, la sous-classe, le nombre de carbones et le nombre d'insaturations des lipides. Cependant, aucune information structurale n'a pu être donnée. En effet, pour obtenir l'identification des lipides et en déterminer la structure, des études par fragmentation auraient pu être menées.

Les perturbations lipidiques observées dans notre étude sont le reflet d'un changement au niveau d'une, voire de plusieurs, voies métaboliques ayant pour origine l'effet d'un xénobiotique. De fait, l'étude des perturbations du lipidome peut donc être vue comme une approche permettant ultérieurement d'orienter une analyse transcriptomique, protéomique ou une étude enzymatique vers un groupe de gènes, de protéines ou d'enzymes afin de caractériser les voies métaboliques perturbées. Cette démarche prend tout son sens lorsque le xénobiotique agit sur un facteur de transcription qui, lui-même, peut être impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes et donc dans le contrôle de nombreuses voies métaboliques.

De plus, bien qu'ayant porté exclusivement sur l'effet du MEHP et de son rôle comme ligand du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , les résultats obtenus lors de notre étude pourraient être utiles dans l'étude d'autres phtalates utilisés dans l'industrie. Effectivement, à l'instar du DEHP dont le principal métabolite est le MEHP, il s'agit également de diesters dont les métabolites de structure très similaire au MEHP pourraient être ligands de PPAR $\gamma$ . Ces métabolites pourraient également être ligands d'autres récepteurs nucléaires et induire un effet cocktail alors difficile à évaluer. Dans le cadre du projet dans lequel s'est inscrit la présente thèse, une étude plus étendue sur 14 phtalates, incluant les diesters et leurs métabolites monoesters, est en cours au laboratoire. En particulier une méthode d'extraction et de dosage de ces derniers par LLE-UPLC-MS est en développement et permettra notamment de quantifier l'ensemble de ces phtalates au niveau des villosités placentaires.



# Annexes



Lipides	Formule moléculaire	Lipides	Formule moléculaire
<b>Acides gras</b>		<b>Phosphatidylglycérols</b>	
FA(16:0)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	PG(14:0/14:0)	C <sub>34</sub> H <sub>67</sub> O <sub>10</sub> P
FA(18:0)	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	PG(16:0/16:0)	C <sub>38</sub> H <sub>75</sub> O <sub>10</sub> P
<b>Diacylglycérols</b>		PG(18:0/18:0)	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> O <sub>10</sub> P
DG(18:1/18:1/0:0)	C <sub>39</sub> H <sub>72</sub> O <sub>5</sub>	PG(18:2/18:2)	C <sub>42</sub> H <sub>75</sub> O <sub>10</sub> P
DG(16:0/18:1/0:0)	C <sub>37</sub> H <sub>70</sub> O <sub>5</sub>	PG(17:0/17:0)	C <sub>40</sub> H <sub>79</sub> O <sub>10</sub> P
DG(14:0/14:0/0:0)	C <sub>31</sub> H <sub>60</sub> O <sub>5</sub>	PG(16:0/18:1)	C <sub>40</sub> H <sub>77</sub> O <sub>10</sub> P
<b>Triacylglycérols</b>		PG(16:0/0:0)	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> O <sub>9</sub> P
TG(18:2/18:2/18:2)	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	<b>Phosphatidyléthanolamines</b>	
TG(16:0/16:0/16:0)	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	PE(14:0/14:0)	C <sub>33</sub> H <sub>66</sub> NO <sub>8</sub> P
<b>Acides phosphatidiques</b>		PE(16:0/16:0)	C <sub>37</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>8</sub> P
PA(14:0/14:0)	C <sub>31</sub> H <sub>61</sub> O <sub>8</sub> P	PE(18:0/18:0)	C <sub>41</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P
PA(16:0/16:0)	C <sub>35</sub> H <sub>69</sub> O <sub>8</sub> P	PE(16:1/16:1)	C <sub>37</sub> H <sub>70</sub> NO <sub>8</sub> P
PA(18:0/18:0)	C <sub>39</sub> H <sub>75</sub> O <sub>8</sub> P	PE(18:0/18:1)	C <sub>41</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P
PA(16:0/18:1)	C <sub>37</sub> H <sub>71</sub> O <sub>8</sub> P	PE(17:0/17:0)	C <sub>39</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P
PA(17:0/17:0)	C <sub>37</sub> H <sub>73</sub> O <sub>8</sub> P	PE(14:0/0:0)	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>7</sub> P
PA(16:0/0:0)	C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	PE(16:0/0:0)	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P
<b>Phosphatidylcholines</b>		PE(18:0/0:0)	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P
PC(17:0/17:0)	C <sub>42</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	<b>Céramides</b>	
PC(18:0/18:2)	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	Cer(d18:1/8:0)	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>3</sub>
PC(18:1/18:1)	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	Cer(d18:1/14:0)	C <sub>32</sub> H <sub>63</sub> NO <sub>3</sub>
PC(20:1/20:1)	C <sub>48</sub> H <sub>92</sub> NO <sub>8</sub> P	Cer(d18:1/16:0)	C <sub>34</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>3</sub>
PC(O-18:0/O-18:0)	C <sub>44</sub> H <sub>92</sub> NO <sub>8</sub> P	Cer(d18:1/17:0)	C <sub>35</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>3</sub>
PC(16:0/0:0)	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	Cer(d18:1/18:0)	C <sub>36</sub> H <sub>71</sub> NO <sub>3</sub>
<b>Phosphatidylsérines</b>		CerP(d18:1/16:0)	C <sub>34</sub> H <sub>68</sub> NO <sub>6</sub> P
PS(14:0/14:0)	C <sub>34</sub> H <sub>66</sub> NO <sub>10</sub> P	<b>Sphingomyélines</b>	
PS(16:0/16:0)	C <sub>38</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>10</sub> P	SM(d18:1/16:0)	C <sub>39</sub> H <sub>79</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P
PS(16:0/18:2)	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>10</sub> P	SM(d18:1/24:1)	C <sub>47</sub> H <sub>93</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P
PS(17:0/17:0)	C <sub>40</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>10</sub> P		
PS(18:0/0:0)	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>9</sub> P		

Annexe 1 : Mélange de lipides standards utilisé pour l'analyse lipidomique globale

Lipides	Régulation A/D (%)	Lipides	Régulation A/D (%)	Lipides	Régulation A/D (%)
<b>Triacylglycérols</b>		<b>Triacylglycérols</b>		<b>Phosphatidyléthanolamines</b>	
TG (63:9)	A (68)	TG (55:6)	A (74)	PE-P (34:0)	D (25)
TG (62:8)	A (70)	TG (61:7)	A (111)	PE-P (34:1)	D (39)
TG (62:5)	A (69)	TG (55:4)	A (55)	PE-P (32:0)	D (34)
TG (60:10)	A (106)	TG (53:3)	A (52)	PE-P (32:1)	D (21)
TG (58:7)	A (63)	TG (51:3)	A (57)	PE-P (38:4)	D (38)
TG (58:10)	A (49)	TG (59:5)	A (89)	PE (34:1)	A (90)
TG (54:2)	A (69)	TG (51:4)	A (39)	PE (44:6)	D (30)
TG (52:2)	A (60)	TG (52:7)	A (40)	PE (44:7)	D (31)
TG (52:1)	A (98)	TG (52:5)	A (56)	PE (38:2)	A (29)
TG (50:1)	A (73)	TG (50:3)	A (40)	PE (38:1)	D (23)
TG (48:1)	A (46)	TG (46:2)	A (70)	PE (36:1)	A (18)
TG (46:1)	A (40)	TG (54:8)	A (42)	PE (36:0)	D (16)
TG (46:0)	A (34)	TG (52:4)	A (50)	PE (38:5)	D (24)
TG (65:10)	A (105)	TG (52:3)	A (57)	PE (32:0)	A (28)
TG (65:9)	A (153)	TG (54:4)	A (64)	PE (34:0)	A (20)
TG (63:8)	A (73)	TG (54:3)	A (73)	LPE (18:1)	D (46)
TG (64:10)	A (88)	TG (48:2)	A (45)	LPE (18:0)	D (41)
TG (62:11)	A (64)	TG (50:4)	A (45)	LPE (22:4)	D (53)
TG (60:11)	A (60)	TG (44:1)	A (39)	LPE (20:0)	D (42)
TG (60:9)	A (118)	<b>Diacylglycérols</b>		<b>Phosphatidylcholines</b>	
TG (60:8)	A (73)	DG (34:1)	D (24)	PC-P (40:3)	D (23)
TG (60:6)	A (127)	DG (40:4)	D (21)	PC-P (40:2)	D (39)
TG (60:7)	A (120)	DG (40:3)	D (28)	PC-P (32:0)	D (13)
TG (60:3)	A (114)	DG (36:4)	D (20)	PC-P (34:1)	D (14)
TG (62:6)	A (83)	DG (32:1)	D (11)	PC-P (38:4)	D (26)
TG (60:4)	A (98)	DG (40:5)	D (31)	PC-P (34:2)	D (20)
TG (62:4)	A (100)	DG (40:6)	D (34)	PC-P (28:0)	D (26)
TG (60:2)	A (91)	DG (38:3)	D (31)	PC-P (32:1)	D (26)
TG (62:3)	A (164)	DG (38:4)	D (28)	PC-P (30:0)	D (27)
TG (59:6)	A (145)	DG (36:3)	D (32)	PC (52:4)	A (81)
TG (58:9)	A (84)	DG (38:5)	D (21)	PC (46:1)	A (79)
TG (58:5)	A (90)	DG (39:3)	D (38)	PC (42:7)	A (26)
TG (58:3)	A (105)	DG (37:3)	D (34)	PC (42:2)	A (51)
TG (56:9)	A (61)	DG (39:4)	D (32)	PC (38:3)	A (28)
TG (56:8)	A (50)	DG (34:2)	D (36)		
TG (56:7)	A (72)	<b>Monoacylglycérols</b>			
TG (56:6)	A (81)	MG (20:3)	D (28)		
TG (58:8)	A (80)	MG (18:0)	D (23)		
TG (58:6)	A (75)	<b>Phosphatidylglycérols</b>			
TG (58:4)	A (101)	PG (36:2)	D (15)		
TG (58:2)	A (138)	PG (40:1)	D (27)		
TG (56:5)	A (71)	PG (34:1)	D (23)		
TG (54:6)	A (62)	<b>Céramides</b>			
TG (58:1)	A (113)	Cer (40:2)	D (36)		
TG (56:4)	A (75)	Cer (40:1)	D (26)		
TG (54:7)	A (34)	Cer (32:1)	D (34)		
TG (54:5)	A (66)				
TG (56:3)	A (93)				
TG (56:2)	A (132)				
TG (50:2)	A (53)				
TG (61:14)	A (126)				
TG (57:8)	A (61)				

Annexe 2 : Régulation des 132 espèces lipidiques annotées lors de l'analyse lipidomique des cellules JEG-3

A : taux augmenté dans les cellules JEG-3 incubées en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h

D : taux diminué dans les cellules JEG-3 incubées en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 72 h

Nom	Symbole	Formule	logP	Masse exacte
<b>Précurseur</b>				
Acide arachidonique	AA	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	5,6	304,2402
<b>Leucotriènes</b>				
Leucotriène B4	LTB4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	4,1	336,2301
Leucotriène C4	LTC4	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	0,7	625,3033
Leucotriène D4	LTD4	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	1,4	496,2607
<b>Prostaglandines</b>				
Prostaglandine F2α	PGF2α	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	2,7	354,2406
8-iso-Prostaglandine F2α	8-iso	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	2,7	354,2406
6-keto-Prostaglandine F1α	6-keto	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	1,4	370,2355
13-14-Dihydro-15-Keto Prostaglandine F2α	13-14-dihydro	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	3,0	354,2406
<b>Thromboxanes</b>				
11-Dehydro Thromboxane B2	11-dehydro	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	2,9	368,2199
<b>Acides dihydroxyeicosatriénoïques</b>				
Acide 5-6-dihydroxyeicosatriénoïque	5-6-DHET	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	4,4	338,2457
Acide 8-9-dihydroxyeicosatriénoïque	8-9-DHET	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	4,4	338,2457
Acide 11-12-dihydroxyeicosatriénoïque	11-12-DHET	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	4,4	338,2457
Acide 14-15-dihydroxyeicosatriénoïque	14-15-DHET	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	4,3	338,2457
<b>Acides époxyeicosatriénoïques</b>				
Acide 8-9-époxyeicosatriénoïque	8-9-EET	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,6	320,2351
Acide 11-12-époxyeicosatriénoïque	11-12-EET	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,6	320,2351
Acide 14-15-époxyeicosatriénoïque	14-15-EET	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,7	320,2351
<b>Acides hydroxyeicosatétraoïques</b>				
Acide 5-hydroxyeicosatétraoïque	5-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,2	320,2351
Acide 8-hydroxyeicosatétraoïque	8-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,2	320,2351
Acide 9-hydroxyeicosatétraoïque	9-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,2	320,2351
Acide 11-hydroxyeicosatétraoïque	11-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,2	320,2351
Acide 12-hydroxyeicosatétraoïque	12-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,2	320,2351
Acide 15-hydroxyeicosatétraoïque	15-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,1	320,2351
Acide 20-hydroxyeicosatétraoïque	20-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	4,7	320,2351
<b>Acides hydroxyoctadécadiénoïques</b>				
Acide 9-hydroxyoctadécadiénoïque	9-HODE	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,3	296,2351
Acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque	13-HODE	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5,3	296,2351
<b>Etalons internes</b>				
Acide arachidonique-d8	AA-d8	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> D <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	5,6	312,2904
Leucotriène B4-d4	LTB4-d4	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> D <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4,1	340,2589
Prostaglandine E2-d4	PGE2-d4	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> D <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	2,8	356,2500
Acide 8-9-époxyeicosatriénoïque-d11	8-9-EET-d11	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> D <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	n.a	331,3143
Acide 12-hydroxyeicosatétraoïque-d8	12-HETE-d8	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> D <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	5,2	328,2854
Acide 15-hydroxyeicosatétraoïque-d8	15-HETE-d8	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> D <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	5,2	328,2854
Acide 20-hydroxyeicosatétraoïque-d6	20-HETE-d6	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> D <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	n.a	326,2783
Acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque-d4	13-HODE-d4	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> D <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	n.a	300,2639
Acide 14-15-dihydroxyeicosatriénoïque-d11	14-15-DHET-d11	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> D <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	n.a	349,3249

Annexe 3 : Mélange d'eicosanoïdes standards utilisé pour la mise au point de la méthode d'analyse

Nom usuel	Nom IUPAC	Formule	Symbole	Masse exacte	logP
Acide arachidique	Acide eicosanoïque	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	AG(20:0)	312,3028	8,0
Acide arachidonique	Acide eicosatétraénoïque	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	AG(20:4)	304,2402	5,6
Acide eicosénoïque	Acide eicosénoïque	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	AG(20:1)	310,2871	8,0
Acide tridécylique	Acide tridécanoïque	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	AG(13:0)	214,1932	4,9
Acide oléique	Acide octadécénoïque	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	AG(18:1)	282,2558	6,7
Acide lignocérique	Acide tétraeicosanoïque	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	AG(24:0)	368,3654	9,8
Acide margarique	Acide heptadécanoïque	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	AG(17:0)	270,2558	6,7

*Annexe 4 : Mélange d'acides gras libres standards utilisé pour établir la relation linéaire entre t<sub>R</sub> et logP*

<b>TaqMan® Gene Expression Assay</b>	
<b>Symbole du gène</b>	<b>N° accès</b>
LOX	NM_001178102.2
PLA1A	NM_001206960.1
PLA2G2A	NM_000300.3
PLA2G3	NM_015715.4
PLA2G5	NM_000929.2
PLA2G12A	NM_030821.4
PLCG1	NM_002660.2
PLD1	NM_001130081.2
PLD2	NM_001243108.1
PLD3	NM_001031696.3
MGAT1	NM_058165.2
MGAT2	NM_025098.3
MGAT3	NM_001287147.1
MGLL	NM_001003794.2
DGAT1	NM_012079.5
DGAT2	NM_001253891.1

*Annexe 5 : Références des amorces utilisées pour l'analyse transcriptomique par RT-qPCR*

Lipides	Régulation A/D (%)	Lipides	Régulation A/D (%)	Lipides	Régulation A/D (%)
<b>Diacylglycérols</b>		<b>Phosphatidylsérines</b>		<b>Phosphatidylcholines</b>	
DG(34:2)	A (36)	PS(34:1)	D (39)	LPC(28:1)	D (35)
DG(35:1)	A (20)	PS(36:2)	D (39)	PC(28:0)	D (31)
DG(35:6)	A (41)	PS(38:0)	D (36)	PC(30:1)	D (30)
DG(36:2)	A (42)	PS(40:0)	D (39)	PC(32:3)	D (28)
DG(36:3)	A (37)	PS(40:1)	D (37)	PC(40:9)	D (34)
DG(36:4)	A (32)	PS(40:2)	D (41)	PC(42:10)	D (33)
DG(36:5)	A (38)	PS(40:3)	D (36)	PC(32:1)	A (8)
DG(38:5)	A (37)	PS(41:3)	A (83)	PC(32:2)	A (46)
DG(38:6)	A (36)	PS(41:4)	D (28)	PC(36:6)	A (7)
DG(38:7)	A (31)	PS(42:1)	D (39)	PC(38:6)	A (4)
DG(40:7)	A (24)	PS(42:4)	D (37)	PC(44:5)	A (2)
DG(40:8)	A (25)	PS(44:1)	D (47)	PC-P(28:0)	D (35)
DG(42:10)	A (24)	PS(44:3)	D (44)	PC-P(30:1)	D (28)
		PS(44:4)	D (39)		
		PS(36:0)	A (8)	<b>Phosphatidylglycérols</b>	
<b>Monoacylglycérols</b>		PS(36:4)	D (15)	LPG(18:1)	A (102)
MG(18:2)	A (40)	PS(38:3)	A (32)	PG(12:0)	A (44)
		PS(40:5)	A (7)	PG(31:2)	D (26)
<b>Acides gras</b>		PS(42:8)	A (9)	PG(32:1)	A (24)
AG(12:0)	A (28)	PS-P(32:0)	D (39)	PG(36:4)	D (39)
AG(12:4)	A (75)	PS-P(38:1)	D (41)	PG(37:4)	D (30)
AG(20:4)	A (98)	PS-P(40:3)	D (41)	PG(39:5)	D (31)
AG(20:5)	A (76)	PS-P(42:0)	D (51)	PG(40:5)	D (36)
AG(22:2)	A (74)	PS-P(32:1)	D (30)	PG(42:6)	D (37)
AG(22:4)	A (72)	PS-P(34:2)	D (39)	PG(44:6)	D (39)
AG(22:5)	A (34)	PS-P(34:3)	D (30)	PG(36:5)	A (37)
AG(24:2)	A (38)	PS-P(42:1)	D (44)	PG-P(40:6)	A (42)
AG(24:3)	A (93)	PS-P(34:1)	A (46)		
AG(24:4)	A (95)	PS-P(34:0)	A (17)		
AG(16:0)-céto	A (36)	PS-P(37:0)	A (19)		
AG(16:1)-hydroxy	A (36)	PS-P(38:4)	A (32)		
AG(16:0)-dihydroxy	A (36)	PS-P(40:4)	A (4)		
AG(24:1)-hydroxy	A (38)				
AG(22:5)-dihydroxy	A (76)				
PGJ2	A (76)*	<b>Phosphatidyléthanolamines</b>			
PGF1 $\alpha$	A (7)*	LPE(16:0)	A (23)		
Dihomo-PGE2	A (76)*	LPE(18:1)	A (20)		
Méthyl-PGE1	A (57)*	LPE(20:1)	A (42)		
Méthyl ester-PGF2 $\alpha$	A (54)*	PE(44:9)	D (37)		
Méthyl ester-PGE2	A (79)*	PE(30:1)	A (28)		
Méthyl ester-Lipoxin A4	A (79)*	PE(30:4)	A (13)		
Dihydro PGF2 $\alpha$	A (9)*	PE(32:0)	A (11)		
		PE(32:2)	A (23)		
		PE(34:1)	A (19)		
<b>Glycérophosphates</b>		PE(34:2)	A (29)		
LPA(20:0)	A (29)	PE(36:1)	A (22)		
LPA(22:0)	A (9)	PE(38:2)	A (19)		
LPA(18:0)	D (15)	PE-P(36:2)	D (22)		
PA(40:7)	D (19)				
PA-P(38:3)	A (10)				
PA-P(40:5)	A (18)				
PA-P(42:4)	A (28)				

Annexe 6 : Régulation des 115 lipides annotés lors de l'analyse lipidomique des cellules trophoblastiques

A : taux augmenté dans les cellules incubées en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h

D : taux diminué dans les cellules incubées en présence de MEHP à 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h

\* : exemple d'annotation

<b>Lipides</b>	<b>Régulation A/D (%)</b>	<b>Lipides</b>	<b>Régulation A/D (%)</b>
<b><i>Diacylglycérols</i></b>		<b><i>Phosphatidylcholines</i></b>	
DG(33:4)	A (5)	LPC(20:0)	D (27)
DG(37:7)	A (33)	PC(30:1)	A (13)
DG(36:2)	A (21)	PC(38:0)	D (23)
DG(36:3)	A (25)	PC(32:4)	A (13)
DG(36:4)	A (18)	PC(38:4)	A (7)
DG(36:5)	A (13)	PC(40:3)	D (23)
DG(38:6)	A (25)	PC(40:7)	D (23)
DG(40:7)	A (19)	PC(42:7)	D (21)
DG(40:8)	A (16)	PC(42:10)	D (23)
DG(42:10)	A (19)	PC(44:10)	D (21)
		PC(44:11)	A (9)
<b><i>Monoacylglycérols</i></b>		PC(46:3)	D (26)
MG(16:0)	A (15)	PC-P(36:2)	A (7)
MG(22:4)	A (24)	PC-P(38:5)	A (7)
<b><i>Acides gras</i></b>		<b><i>Phosphatidylglycérols</i></b>	
AG(22:4)	A (7)	PG(40:8)	D (10)
AG(24:4)	A (10)	PG(36:2)	A (11)
AG(38:5)	A (14)	PG(44:7)	D (6)
<b><i>Phosphatidylsérines</i></b>		PG-P(38:0)	A (7)
PS(40:2)	D (27)	PG-P(40:6)	A (19)
PS(40:6)	D (10)	PG-P(32:0)	A (19)
PS(38:3)	D (10)	PG-P(40:5)	A (27)
PS(44:2)	D (28)		
PS-P(34:2)	D (13)		
PS-P(38:0)	D (27)		
PS-P(38:4)	D (8)		
PS-P(40:3)	D (27)		
PS-P(42:1)	D (23)		
<b><i>Phosphatidyléthanolamines</i></b>			
LPE(18:1)	A (9)		
LPE(20:4)	A (9)		
LPE(18:0)	A (73)		
PE(36:0)	A (7)		
PE-P(36:1)	A (7)		

Annexe 7 : Régulation des 50 lipides annotés lors de l'analyse lipidomique des cellules trophoblastiques

A : taux augmenté dans les cellules incubées en présence de MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h

D : taux diminué dans les cellules incubées en présence de MEHP à 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durant 48 h



## Références bibliographiques



1. Alsat, E. & Evain-Brion, D. Le placenta humain : neuf mois d'une intense activité encore méconnue. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* **1**, 509–16 (1999).
2. Placenta Banque D'Images, Vecteurs Et Illustrations Libres De Droits. *123RF Stock Photos* Available at:  
[http://fr.123rf.com/search.php?word=placenta&srch\\_lang=fr&imgtype=&Submit=+&t\\_word=&t\\_lang=fr&orderby=0&sti=o5rdyevt2x9g3cc803](http://fr.123rf.com/search.php?word=placenta&srch_lang=fr&imgtype=&Submit=+&t_word=&t_lang=fr&orderby=0&sti=o5rdyevt2x9g3cc803). (Accessed: 15th July 2016)
3. Benirschke, K. & Kaufmann, P. *Pathology of the Human Placenta*. (Springer New York, 2000).
4. Benirschke, K., Burton, G. J. & Baergen, R. N. in *Pathology of the Human Placenta* 41–53 (Springer Berlin Heidelberg, 2012). doi:10.1007/978-3-642-23941-0\_5
5. Enders, A. C. Trophoblast differentiation during the transition from trophoblastic plate to lacunar stage of implantation in the rhesus monkey and human. *Am. J. Anat.* **186**, 85–98 (1989).
6. Alsat, E., Malassiné, A., Tarrade, A., Merviel, P. & Evain-Brion, D. Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste. *médecine/sciences* **15**, 1236 (1999).
7. Fournier, T., Tsatsaris, V., Handschuh, K. & Evain-Brion, D. Rôle de PPAR $\gamma$  dans le développement du placenta humain. *Médecine Thérapeutique Médecine Reprod.* **9**, 92–97 (2007).
8. Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B. & King, R. G. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* **114**, 397–407 (2004).
9. Evain-Brion, D. [The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* **29**, 497–502 (2001).
10. Evain-Brion, D. *Le placenta humain*. (Lavoisier, 2010).
11. Pasanen, M. The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **38**, 81–97 (1999).
12. Ben-Hur, H. *et al.* Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation. *Int. J. Mol. Med.* **16**, 401–407 (2005).

13. Simister, N. E. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* **21**, 3365–3369 (2003).
14. Kristoffersen, E. K. Placental Fc receptors and the transfer of maternal IgG. *Transfus. Med. Rev.* **14**, 234–243 (2000).
15. Lye, S. J. & Porter, D. G. Demonstration that progesterone ‘blocks’ uterine activity in the ewe in vivo by a direct action on the myometrium. *J. Reprod. Fertil.* **52**, 87–94 (1978).
16. Siiteri, P. K. & MacDonald, P. C. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 751–761 (1966).
17. Linnemann, K. *et al.* Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 4298–4301 (2000).
18. Evain-Brion, D. & Malassine, A. Human placenta as an endocrine organ. *Growth Horm. IGF Res.* **13, Supplement**, S34–S37 (2003).
19. Leiser, R. & Kaufmann, P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin. Endocrinol.* **102**, 122–134 (1994).
20. Aplin, J. D., Haigh, T., Jones, C. J., Church, H. J. & Vićovac, L. Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin alpha5beta1. *Biol. Reprod.* **60**, 828–838 (1999).
21. Dunk, C. *et al.* A novel in vitro model of trophoblast-mediated decidual blood vessel remodeling. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **83**, 1821–1828 (2003).
22. Tarrade, A. *et al.* Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **81**, 1199–1211 (2001).
23. Handschuh, K. *et al.* Modulation of PAPP-A expression by PPARgamma in human first trimester trophoblast. *Placenta* **27 Suppl A**, S127-134 (2006).
24. Harris, L. K., Baker, P. N., Brenchley, P. E. C. & Aplin, J. D. Trophoblast-derived heparanase is not required for invasion. *Placenta* **29**, 332–337 (2008).
25. Frank, H. G. *et al.* Cell culture models of human trophoblast--primary culture of trophoblast--a workshop report. *Placenta* **21 Suppl A**, S120-122 (2000).

26. Tarrade, A. *et al.* Effect of matrigel on human extravillous trophoblasts differentiation: modulation of protease pattern gene expression. *Biol. Reprod.* **67**, 1628–1637 (2002).
27. Ruddon, R. W., Hanson, C. A. & Addison, N. J. Synthesis and processing of human chorionic gonadotropin subunits in cultured choriocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 5143–5147 (1979).
28. Kohler, P. O. *et al.* Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture. *Acta Endocrinol. Suppl. (Copenh.)* **153**, 137–153 (1971).
29. Pattillo, R. A. & Gey, G. O. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res.* **28**, 1231–1236 (1968).
30. Wice, B., Menton, D., Geuze, H. & Schwartz, A. L. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp. Cell Res.* **186**, 306–316 (1990).
31. Irving, J. A. & Lala, P. K. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp. Cell Res.* **217**, 419–427 (1995).
32. Graham, C. H. *et al.* Establishment and Characterization of First Trimester Human Trophoblast Cells with Extended Lifespan. *Exp. Cell Res.* **206**, 204–211 (1993).
33. Pavan, L. *et al.* Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPAR $\gamma$  in cell invasion process. *Carcinogenesis* **24**, 1325–1336 (2003).
34. Choy, M. Y. & Manyonda, I. T. The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **13**, 2941–2949 (1998).
35. Aplin, J. D. *et al.* Trophoblast differentiation: progenitor cells, fusion and migration -- a workshop report. *Placenta* **27 Suppl A**, S141-143 (2006).
36. Logan, S. K., Fisher, S. J. & Damsky, C. H. Human placental cells transformed with temperature-sensitive simian virus 40 are immortalized and mimic the phenotype of invasive cytotrophoblasts at both permissive and nonpermissive temperatures. *Cancer Res.* **52**, 6001–6009 (1992).

37. Lewis, M. P. *et al.* Partial characterization of an immortalized human trophoblast cell-line, TCL-1, which possesses a CSF-1 autocrine loop. *Placenta* **17**, 137–146 (1996).
38. Feng, H. C. *et al.* Establishment and characterization of a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (TEV-1). *J. Soc. Gynecol. Investig.* **12**, e21-32 (2005).
39. King, A. *et al.* Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* **21**, 376–387 (2000).
40. Manyonda, I. T., Whitley, G. S. & Cartwright, J. E. Trophoblast cell lines: a response to the Workshop Report by King *et al.* *Placenta* **22**, 262–263 (2001).
41. King, A., Thomas, L. & Bischof, P. Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report. *Placenta* **21 Suppl A**, S113-119 (2000).
42. Gremlich, S. *et al.* The long non-coding RNA NEAT1 is increased in IUGR placentas, leading to potential new hypotheses of IUGR origin/development. *Placenta* **35**, 44–49 (2014).
43. Diplas, A. I. *et al.* Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics* **4**, 235–240 (2009).
44. Zamecznik, A. *et al.* Intra-uterine growth restriction as a risk factor for hypertension in children six to 10 years old. *Cardiovasc. J. Afr.* **25**, 73–77 (2014).
45. Roberts, J. & Cooper, D. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *The Lancet* **357**, 53–56 (2001).
46. Cooper, D. W., Hill, J. A., Chesley, L. C. & Bryans, C. I. Genetic control of susceptibility to eclampsia and miscarriage. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **95**, 644–653 (1988).
47. Esplin, M. S. *et al.* Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* **344**, 867–872 (2001).
48. Dekker, G., Robillard, P. Y. & Roberts, C. The etiology of preeclampsia: the role of the father. *J. Reprod. Immunol.* **89**, 126–132 (2011).
49. Dekker, G. The partner's role in the etiology of preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **57**, 203–215 (2002).

50. Steegers, E. A., von Dadelszen, P., Duvekot, J. J. & Pijnenborg, R. Pre-eclampsia. *The Lancet* **376**, 631–644 (2010).
51. Walker, J. J. Pre-eclampsia. *The Lancet* **356**, 1260–1265 (2000).
52. Meekins, J. W., Pijnenborg, R., Hanssens, M., McFadyen, I. R. & van Asshe, A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **101**, 669–674 (1994).
53. Huppertz, B., Kadyrov, M. & Kingdom, J. C. P. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **195**, 29–39 (2006).
54. Morris, J. M. *et al.* Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **105**, 1195–1199 (1998).
55. Roberts, J. M. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **16**, 5–15 (1998).
56. Khalil, R. A. & Granger, J. P. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **283**, R29-45 (2002).
57. Tsatsaris, V., Fournier, T. & Winer, N. Physiopathologie de la prééclampsie. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* **37**, 16–23 (2008).
58. Kar, M. Role of Biomarkers in Early Detection of Preeclampsia. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **8**, BE01-BE04 (2014).
59. Dunn, W. B. *et al.* The metabolome of human placental tissue: investigation of first trimester tissue and changes related to preeclampsia in late pregnancy. *Metabolomics* **8**, 579–597 (2011).
60. Agarwal, V. *et al.* Association of Lipid Profile and Uric Acid with Pre-eclampsia of Third Trimester in Nullipara Women. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **8**, CC04-CC07 (2014).
61. Ray, J., Diamond, P., Singh, G. & Bell, C. Brief overview of maternal triglycerides as a risk factor for pre-eclampsia. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **113**, 379–386 (2006).
62. F, B. A. and K. K. Role of Triglycerides –In Severity of Pre-Eclampsia. *J. Physiol. Pharmacol. Adv.* **2**, 360–364 (2012).

63. Douglas, G. C., Fazely, F. & Hu, J. J. Transmission of HIV to the placenta, fetus and mother and implications of gametic infection. *J. Reprod. Immunol.* **41**, 321–329 (1998).
64. Robbins, J. R., Zeldovich, V. B., Poukchanski, A., Boothroyd, J. C. & Bakardjiev, A. I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **80**, 418–428 (2012).
65. Abbasi, M. *et al.* Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* **188**, 608–616 (2003).
66. Garcia, A. G., Marques, R. L., Lobato, Y. Y., Fonseca, M. E. & Wigg, M. D. Placental pathology in congenital rubella. *Placenta* **6**, 281–295 (1985).
67. Yazigi, A. *et al.* Fetal and neonatal abnormalities due to congenital rubella syndrome: a review of literature. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* 1–5 (2016).  
doi:10.3109/14767058.2016.1169526
68. Hampton, M. M. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Neonatal Netw. NN* **34**, 274–278 (2015).
69. Modrzejewska, M., Patalan, J., Kulik, U. & Czeszyńska, M. B. Ocular manifestation of congenital toxoplasmosis, clinical implication - case report. *Ginekol. Pol.* **87**, 226–230 (2016).
70. Reports - Endocrine disruptors - Environment - European Commission. Available at: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/documents/reports\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/documents/reports_en.htm). (Accessed: 6th July 2016)
71. Henderson, B. E. *et al.* Urogenital tract abnormalities in sons of women treated with diethylstilbestrol. *Pediatrics* **58**, 505–507 (1976).
72. Palmer, J. R. *et al.* Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* **8**, 37 (2009).
73. Hoover, R. N. *et al.* Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1304–1314 (2011).

74. Kalfa, N., Paris, F., Soyer-Gobillard, M.-O., Daures, J.-P. & Sultan, C. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil. Steril.* **95**, 2574–2577 (2011).
75. Pons, J. C., Papiernik, E., Billon, A., Hessabi, M. & Duyme, M. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Prenat. Diagn.* **25**, 418–419 (2005).
76. Nam, S.-H., Seo, Y.-M. & Kim, M.-G. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere* **79**, 949–952 (2010).
77. Sharma, R., Kotyk, M. W. & Wiltshire, W. A. An investigation into bisphenol A leaching from materials used intraorally. *J. Am. Dent. Assoc.* **147**, 545–550 (2016).
78. Liao, C. & Kannan, K. Widespread Occurrence of Bisphenol A in Paper and Paper Products: Implications for Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 9372–9379 (2011).
79. Amaral Mendes, J. J. The endocrine disruptors: a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 781–788 (2002).
80. Multigner, L. & Kadhel, P. Perturbateurs endocriniens, concepts et réalité. *Arch. Mal. Prof. Environ.* **69**, 710–717 (2008).
81. Casals-Casas, C. & Desvergne, B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 135–162 (2011).
82. Yang, O., Kim, H. L., Weon, J.-I. & Seo, Y. R. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J. Cancer Prev.* **20**, 12–24 (2015).
83. Agopian, A. J., Lupo, P. J., Canfield, M. A. & Langlois, P. H. Case-control study of maternal residential atrazine exposure and male genital malformations. *Am. J. Med. Genet. A.* **161A**, 977–982 (2013).
84. Palanza, P., Morellini, F., Parmigiani, S. & vom Saal, F. S. Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on behavioral development. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**, 1011–1027 (1999).

85. Birnbaum, L. S. & Fenton, S. E. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* **111**, 389–394 (2003).
86. Swedenborg, E., Rüegg, J., Mäkelä, S. & Pongratz, I. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J. Mol. Endocrinol.* **43**, 1–10 (2009).
87. Casals-Casas, C., Feige, J. N. & Desvergne, B. Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. *Int. J. Obes. 2005* **32 Suppl 6**, S53-61 (2008).
88. Juberg, D. R. *et al.* Chlorpyrifos: weight of evidence evaluation of potential interaction with the estrogen, androgen, or thyroid pathways. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* **66**, 249–263 (2013).
89. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).
90. Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645–650 (1990).
91. Schaiff, W. T. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Modulates Differentiation of Human Trophoblast in a Ligand-Specific Manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3874–3881 (2000).
92. Chinetti, G., Fruchart, J.-C. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* **49**, 497–505
93. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H. & Evans, R. M. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ . *Cell* **93**, 229–240 (1998).
94. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4318–4323 (1997).

95. Davies, S. S. *et al.* Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J. Biol. Chem.* **276**, 16015–16023 (2001).
96. Fournier, T., Handschuh, K., Tsatsaris, V., Guibourdenche, J. & Evain-Brion, D. Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* **77**, 161–170 (2008).
97. Xu, Y., Wang, Q., Cook, T. J. & Knipp, G. T. Effect of placental fatty acid metabolism and regulation by peroxisome proliferator activated receptor on pregnancy and fetal outcomes. *J. Pharm. Sci.* **96**, 2582–2606 (2007).
98. Lehmann, J. M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* **270**, 12953–12956 (1995).
99. Willson, T. M. *et al.* The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J. Med. Chem.* **39**, 665–668 (1996).
100. Lehmann, J. M., Lenhard, J. M., Oliver, B. B., Ringold, G. M. & Kliewer, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* **272**, 3406–3410 (1997).
101. Maloney, E. K. & Waxman, D. J. trans-Activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by Structurally Diverse Environmental Chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **161**, 209–218 (1999).
102. Lovekamp-Swan, T., Jetten, A. M. & Davis, B. J. Dual activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **201**, 133–141 (2003).
103. Hurst, C. H. & Waxman, D. J. Activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by Environmental Phthalate Monoesters. *Toxicol. Sci.* **74**, 297–308 (2003).
104. Nolte, R. T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Nature* **395**, 137–143 (1998).

105. Cronet, P. *et al.* Structure of the PPAR $\alpha$  and - $\gamma$  Ligand Binding Domain in Complex with AZ 242; Ligand Selectivity and Agonist Activation in the PPAR Family. *Structure* **9**, 699–706 (2001).
106. Sheu, S.-H., Kaya, T., Waxman, D. J. & Vajda, S. Exploring the Binding Site Structure of the PPAR $\gamma$  Ligand-Binding Domain by Computational Solvent Mapping. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 1193–1209 (2005).
107. Itoh, T. *et al.* Structural basis for the activation of PPAR $\gamma$  by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 924–931 (2008).
108. Berger, J. & Moller, D. E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* **53**, 409–435 (2002).
109. Uppenberg, J. *et al.* Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Human Nuclear Receptor PPAR $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* **273**, 31108–31112 (1998).
110. Xu, H. E. *et al.* Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* **3**, 397–403 (1999).
111. Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. & Evans, R. M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**, 771–774 (1992).
112. Gelman, L., Fruchart, J.-C. & Auwerx, J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **55**, 932–943
113. Nikolenko, I. V. & Krasnov, A. N. [Nuclear receptors: structure and mechanisms of action]. *Genetika* **43**, 308–316 (2007).
114. Fournier, T., Tsatsaris, V., Handschuh, K. & Evain-Brion, D. PPARs and the Placenta. *Placenta* **28**, 65–76 (2007).
115. Matsuo, H. & Strauss, J. F. Peroxisome proliferators and retinoids affect JEG-3 choriocarcinoma cell function. *Endocrinology* **135**, 1135–1145 (1994).
116. Schaiff, W. T., Barak, Y. & Sadovsky, Y. The pleiotropic function of PPAR  $\gamma$  in the placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.* **249**, 10–15 (2006).

117. Barak, Y. *et al.* PPAR $\gamma$  Is Required for Placental, Cardiac, and Adipose Tissue Development. *Mol. Cell* **4**, 585–595 (1999).
118. Kubota, N. *et al.* PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* **4**, 597–609 (1999).
119. Sapin, V., Dollé, P., Hindelang, C., Kastner, P. & Chambon, P. Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXR $\alpha$  null fetuses. *Dev. Biol.* **191**, 29–41 (1997).
120. Tarrade, A. *et al.* PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  Heterodimers Control Human Trophoblast Invasion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5017–5024 (2001).
121. Herrera, D. E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* **19**, 43–55 (2002).
122. Duttaroy, A. K. Transport of fatty acids across the human placenta: A review. *Prog. Lipid Res.* **48**, 52–61 (2009).
123. Schaiff, W. T. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  and Retinoid X Receptor Signaling Regulate Fatty Acid Uptake by Primary Human Placental Trophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 4267–4275 (2005).
124. Johnsen, G. M., Weedon-Fekjær, M. S., Tobin, K. A. R., Staff, A. C. & Duttaroy, A. K. Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids Stimulate Cellular Fatty Acid Uptake in Human Placental Choriocarcinoma (BeWo) Cells. *Placenta* **30**, 1037–1044 (2009).
125. Johansen, B., Rakkestad, K., Balboa, M. A. & Dennis, E. A. Expression of cytosolic and secreted forms of phospholipase A(2) and cyclooxygenases in human placenta, fetal membranes, and chorionic cell lines. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **60**, 119–125 (2000).
126. Jowsey, I. R. *et al.* Prostaglandin D2 synthase enzymes and PPAR $\gamma$  are co-expressed in mouse 3T3-L1 adipocytes and human tissues. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **70**, 267–284 (2003).
127. Capobianco, E. *et al.* PPAR activation as a regulator of lipid metabolism, nitric oxide production and lipid peroxidation in the placenta from type 2 diabetic patients. *Mol. Cell. Endocrinol.* **377**, 7–15 (2013).

128. Nadine Segond, S. A. D. Transcriptome Analysis of PPAR $\gamma$  Target Genes Reveals the Involvement of Lysyl Oxidase in Human Placental Cytotrophoblast Invasion. *PLoS One* **8**, e79413 (2013).
129. Shalom-Barak, T. *et al.* Placental PPAR $\gamma$  regulates spatiotemporally diverse genes and a unique metabolic network. *Dev. Biol.* **372**, 143–155 (2012).
130. Hanebutt, F. L., Demmelmair, H., Schiessl, B., Larqué, E. & Koletzko, B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin. Nutr.* **27**, 685–693 (2008).
131. KEGG PATHWAY: PPAR signaling pathway - Homo sapiens (human). Available at: [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa03320](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa03320). (Accessed: 19th July 2016)
132. Peakall, D. B. in *Residue Reviews* (eds. Gunther, F. A. & Gunther, J. D.) 1–41 (Springer New York, 1975).
133. IARC Monographs - Monographs available in PDF format. Available at: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/>. (Accessed: 25th July 2016)
134. *European Union Risk Assessment Report - bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)*. (OPOCE, 2008).
135. Thomas, J. A., Darby, T. D., Wallin, R. F., Garvin, P. J. & Martis, L. A review of the biological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**, 1–27 (1978).
136. etalon - chemicalize.org. Available at: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=DEHP&source=fp>. (Accessed: 22nd July 2016)
137. Fromme, H. *et al.* Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: Results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. *Environ. Int.* **33**, 1012–1020 (2007).
138. Anderson, W. A. C., Castle, L., Scotter, M. J., Massey, R. C. & Springall, C. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Addit. Contam.* **18**, 1068–1074 (2001).

139. Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M. & Hungerbühler, K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal. Off. Publ. Soc. Risk Anal.* **26**, 803–824 (2006).
140. Perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution. Available at: <http://www.senat.fr/rap/r10-765/r10-765.html>. (Accessed: 26th July 2016)
141. Pénétration cutanée et métabolisme du phtalate du di(2-éthylhexyle) (DEHP - Publication scientifique - INRS. Available at: <http://www.inrs.fr/inrs/recherche/etudes-publications-communications/doc/publication.html?refINRS=B.4/2.163/P2013-198>. (Accessed: 26th July 2016)
142. Fishbein, L. Exposure from occupational versus other sources. *Scand. J. Work. Environ. Health* **18 Suppl 1**, 5–16 (1992).
143. Karle, V. A. *et al.* Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di(2-ethylhexyl)phthalate. *Crit. Care Med.* **25**, 696–703 (1997).
144. Tickner, J. A., Schettler, T., Guidotti, T., McCally, M. & Rossi, M. Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review. *Am. J. Ind. Med.* **39**, 100–111 (2001).
145. Jaeger, R. J. & Rubin, R. J. Plasticizers from plastic devices extraction, metabolism, and accumulation by biological systems. *Science* **170**, 460–462 (1970).
146. Jaeger, R. J. & Rubin, R. J. Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *N. Engl. J. Med.* **287**, 1114–1118 (1972).
147. Marcel, Y. L. Determination of di-2-ethylhexyl phthalate levels in human blood plasma and cryoprecipitates. *Environ. Health Perspect.* **3**, 119–121 (1973).
148. Weuve, J. *et al.* Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. *Environ. Health Perspect.* **114**, 1424–1431 (2006).

149. Calafat, A. M., Needham, L. L., Silva, M. J. & Lambert, G. Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* **113**, e429-434 (2004).
150. Green, R. *et al.* Use of di(2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environ. Health Perspect.* **113**, 1222–1225 (2005).
151. Silva, M. J., Samandar, E., Preau, J. L., Needham, L. L. & Calafat, A. M. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology* **219**, 22–32 (2006).
152. Kessler, W. *et al.* Blood burden of di(2-ethylhexyl) phthalate and its primary metabolite mono(2-ethylhexyl) phthalate in pregnant and nonpregnant rats and marmosets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 142–153 (2004).
153. Koch, H. M., Bolt, H. M. & Angerer, J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* **78**, 123–130 (2003).
154. Kato, K. *et al.* Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* **112**, 327–330 (2004).
155. Koch, H. M., Rossbach, B., Drexler, H. & Angerer, J. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates—determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ. Res.* **93**, 177–185 (2003).
156. Cresteil, T. Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications. *Food Addit. Contam.* **15 Suppl**, 45–51 (1998).
157. Kavlock, R. *et al.* NTP-CERHR Expert Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **22**, 291–399 (2006).
158. Silva, M. J. *et al.* Detection of Phthalate Metabolites in Human Amniotic Fluid. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **72**, 1226–1231 (2004).

159. Latini, G. *et al.* In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1783–1785 (2003).
160. Mose, T., Mortensen, G. K., Hedegaard, M. & Knudsen, L. E. Phthalate monoesters in perfusate from a dual placenta perfusion system, the placenta tissue and umbilical cord blood. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **23**, 83–91 (2007).
161. Main, K. M. *et al.* Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ. Health Perspect.* **114**, 270–276 (2006).
162. Latini, G., Del Vecchio, A., Massaro, M., Verrotti, A. & DE Felice, C. In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr. Med. Chem.* **13**, 2527–2534 (2006).
163. Fisher, J. S., Macpherson, S., Marchetti, N. & Sharpe, R. M. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **18**, 1383–1394 (2003).
164. Foster, P. M. D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int. J. Androl.* **29**, 140-147-185 (2006).
165. Sharpe, R. M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **20**, 91–110 (2006).
166. Lyche, J. L. *et al.* Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **12**, 225–249 (2009).
167. Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M. & Ema, M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **50**, 37–49 (2008).
168. Rozati, R., Reddy, P. P., Reddanna, P. & Mujtaba, R. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil. Steril.* **78**, 1187–1194 (2002).
169. Lambrot, R. *et al.* Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ. Health Perspect.* **117**, 32–37 (2009).

170. Pan, G. *et al.* Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ. Health Perspect.* **114**, 1643–1648 (2006).
171. Cobellis, L. *et al.* High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **18**, 1512–1515 (2003).
172. Reddy, B. S., Rozati, R., Reddy, B. V. R. & Raman, N. V. V. S. S. Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **113**, 515–520 (2006).
173. Swan, S. H. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ. Res.* **108**, 177–184 (2008).
174. Ferguson, K. K., McElrath, T. F. & Meeker, J. D. Environmental phthalate exposure and preterm birth. *JAMA Pediatr.* **168**, 61–67 (2014).
175. Tomita, I., Nakamura, Y., Yagi, Y. & Tutikawa, K. Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in mice. *Environ. Health Perspect.* **65**, 249–254 (1986).
176. MSDS - 796832. Available at:  
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=FR&language=fr&productNumber=796832&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Finterface%3DCAS%2520No.%26term%3D4376-20-9%26N%3D0%26lang%3Dfr%26region%3DFR%26focus%3Dproduct%26mode%3Dmode%2Bmatchall>. (Accessed: 1st August 2016)
177. Yagi, Y., Nakamura, Y., Tomita, I., Tsuchikawa, K. & Shimoi, N. Teratogenic potential of di- and mono-(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **4**, 533–544 (1980).
178. Meeker, J. D. *et al.* Urinary phthalate metabolites in relation to preterm birth in Mexico city. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1587–1592 (2009).
179. Zhang, Y. *et al.* Phthalate levels and low birth weight: a nested case-control study of Chinese newborns. *J. Pediatr.* **155**, 500–504 (2009).

180. Shi, C. *et al.* Cytotoxic effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human embryonic stem cells. *Chin. Med. J. (Engl.)* **126**, 1714–1719 (2013).
181. Muczynski, V. *et al.* Cellular and Molecular Effect of MEHP Involving LXR $\alpha$  in Human Fetal Testis and Ovary. *PLoS ONE* **7**, e48266 (2012).
182. Bell, F. P. & Nazir, D. J. Effect of dietary di-2-ethylhexyl phthalate on lipid biosynthesis in selected tissues from the rat, in vitro. *Lipids* **11**, 216–221 (1976).
183. Zhang, J. *et al.* The metabonomics of combined dietary exposure to phthalates and polychlorinated biphenyls in mice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **66**, 287–297 (2012).
184. Mitchell, F. E., Bridges, J. W. & Hinton, R. H. Effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate and its straight chain analogues mono-n-hexylphthalate and mono-n-octyl phthalate on lipid metabolism in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2941–2947 (1986).
185. Xu, Y., Knipp, G. T. & Cook, T. J. Effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate and its metabolites on the lipid profiling in rat HRP-1 trophoblast cells. *Arch. Toxicol.* **80**, 293–298 (2006).
186. Ding, H. *et al.* Activation of Peroxisome Proliferator Activator Receptor Delta in Mouse Impacts Lipid Composition and Placenta Development at Early Stage Of Gestation. *Biol. Reprod.* [biolreprod.113.116772](https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116772) (2014). doi:10.1095/biolreprod.113.116772
187. Capobianco, E., White, V., Higa, R., Martínez, N. & Jawerbaum, A. Effects of natural ligands of PPAR $\gamma$  on lipid metabolism in placental tissues from healthy and diabetic rats. *Mol. Hum. Reprod.* **14**, 491–499 (2008).
188. Bility, M. T. *et al.* Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **82**, 170–182 (2004).
189. Fahy, E., Cotter, D., Sud, M. & Subramaniam, S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta* **1811**, 637–647 (2011).
190. Kihara, A. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem. (Tokyo)* **152**, 387–395 (2012).

191. S J Wakil, J K Stoops & Joshi, and V. C. Fatty Acid Synthesis and its Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 537–579 (1983).
192. Jakobsson, A., Westerberg, R. & Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **45**, 237–249 (2006).
193. Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P. & Jacobsson, A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* **49**, 186–199 (2010).
194. Rowley, A. F., Kühn, H. & Schewe, T. *Eicosanoids and Related Compounds in Plants and Animals*. (Princeton University Press, 2015).
195. Fahy, E. *et al.* A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, 839–862 (2005).
196. Fahy, E. *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S9-14 (2009).
197. Carrasco, S. & Mérida, I. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 27–36 (2007).
198. Cases, S. *et al.* Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 13018–13023 (1998).
199. Yu, J. H. *et al.* Monoacylglycerol O-acyltransferase 1 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in human hepatocytes and increases lipid accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 715–720 (2015).
200. Liu, Q., Siloto, R. M. P., Lehner, R., Stone, S. J. & Weselake, R. J. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: Molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Prog. Lipid Res.* **51**, 350–377 (2012).
201. Yen, C.-L. E., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C. & Farese, R. V. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **49**, 2283–2301 (2008).

202. Waterman, I. J., Emmison, N. & Dutta-Roy, A. K. Characterisation of triacylglycerol hydrolase activities in human placenta. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1394**, 169–176 (1998).
203. Devaux, P. F. & Morris, R. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic Cph. Den.* **5**, 241–246 (2004).
204. Jin, H.-H. & Jiang, J.-G. Phosphatidic Acid Phosphatase and Diacylglycerol Acyltransferase: Potential Targets for Metabolic Engineering of Microorganism Oil. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3067–3077 (2015).
205. KEGG PATHWAY: Glycerophospholipid metabolism - Homo sapiens (human). Available at: [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00564](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00564). (Accessed: 5th August 2016)
206. Bou Khalil, M. *et al.* Lipidomics era: accomplishments and challenges. *Mass Spectrom. Rev.* **29**, 877–929 (2010).
207. Cockcroft, S. Mammalian phosphatidylinositol transfer proteins: emerging roles in signal transduction and vesicular traffic. *Chem. Phys. Lipids* **98**, 23–33 (1999).
208. Vicinanza, M., D'Angelo, G., Di Campli, A. & De Matteis, M. A. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J.* **27**, 2457–2470 (2008).
209. Arbuzova, A. *et al.* Fluorescently labeled neomycin as a probe of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1464**, 35–48 (2000).
210. Dove, S. K. *et al.* Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* **390**, 187–192 (1997).
211. Obeid, L. M., Linaudic, C. M., Karolak, L. A. & Hannun, Y. A. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769–1771 (1993).
212. Hannun, Y. A. & Luberto, C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* **10**, 73–80 (2000).

213. Pettus, B. J., Chalfant, C. E. & Hannun, Y. A. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1585**, 114–125 (2002).
214. Slotte, J. P. Biological functions of sphingomyelins. *Prog. Lipid Res.* **52**, 424–437 (2013).
215. Gault, C. R., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**, 1–23 (2010).
216. Cholestérol - Société Chimique de France. Available at:  
<http://www.societechimiquedefrance.fr/cholesterol>. (Accessed: 11th August 2016)
217. Morozova, S., Suc-Royer, I. & Auwerx, J. Modulateurs du métabolisme du cholestérol et avenir du traitement de l'athérosclérose. *MS Médecine Sci.* **20**, 685–690 (2004).
218. Saile, R. & Hassan, T. Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose: de la biochimie à la physiopathologie. Available at:  
[https://www.researchgate.net/publication/26844393\\_Cholesterol\\_lipoproteines\\_et\\_atherosclerose\\_de\\_la\\_biochimie\\_a\\_la\\_physiopathologie](https://www.researchgate.net/publication/26844393_Cholesterol_lipoproteines_et_atherosclerose_de_la_biochimie_a_la_physiopathologie). (Accessed: 11th August 2016)
219. Breuer, O. & Björkhem, I. Use of an <sup>18</sup>O<sub>2</sub> inhalation technique and mass isotopomer distribution analysis to study oxygenation of cholesterol in rat. Evidence for in vivo formation of 7-oxo-, 7 beta-hydroxy-, 24-hydroxy-, and 25-hydroxycholesterol. *J. Biol. Chem.* **270**, 20278–20284 (1995).
220. Bösiinger, S., Luf, W. & Brandl, E. 'Oxysterols': Their occurrence and biological effects. *Int. Dairy J.* **3**, 1–33 (1993).
221. Lyons, M. A. & Brown, A. J. 7-Ketocholesterol. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 369–375 (1999).
222. Souidi, M. *et al.* Les oxystérols : métabolisme, rôles biologiques et pathologies associées. */data/revues/03998320/00280003/279/* (2008).
223. Peet, D. J., Janowski, B. A. & Mangelsdorf, D. J. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 571–575 (1998).

224. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831–2838 (2000).
225. Blasco, H. & Corcia, P. Une nouvelle 'omique': l'approche métabolomique. Available at: [http://association.gens.free.fr/NEUROLOGIA/Revues%20Neuro%20Articles/DIVERS/\\$Metabolomique%20aproche.pdf](http://association.gens.free.fr/NEUROLOGIA/Revues%20Neuro%20Articles/DIVERS/$Metabolomique%20aproche.pdf). (Accessed: 11th August 2016)
226. Nicholson, J. K., Lindon, J. C. & Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **29**, 1181–1189 (1999).
227. Ezan, E. L'analyse du métabolome : un nouvel outil pour les biologistes. Available at: <http://www.academie-agriculture.fr/seances/la-metabolomique>. (Accessed: 11th August 2016)
228. Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C. & Holmes, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 153–161 (2002).
229. Yang, L. *et al.* Recent advances in lipidomics for disease research. *J. Sep. Sci.* **39**, 38–50 (2016).
230. Cajka, T. & Fiehn, O. Increasing lipidomic coverage by selecting optimal mobile-phase modifiers in LC–MS of blood plasma. *Metabolomics* **12**, 34 (2016).
231. Cajka, T. & Fiehn, O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Anal. Chem. TRAC* **61**, 192–206 (2014).
232. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).
233. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
234. Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, A. G. & Zárata, R. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 4297–4303 (2008).

235. Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A. & Schwudke, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* **49**, 1137–1146 (2008).
236. Pichon, V. *Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques*.
237. Juaneda, P. & Rocquelin, G. Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* **20**, 40–41 (1985).
238. Li, M., Yang, L., Bai, Y. & Liu, H. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Anal. Chem.* **86**, 161–175 (2014).
239. Ferreiro-Vera, C., Priego-Capote, F. & Luque de Castro, M. D. Comparison of sample preparation approaches for phospholipids profiling in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1240**, 21–28 (2012).
240. Dumlao, D. S., Buczynski, M. W., Norris, P. C., Harkewicz, R. & Dennis, E. A. High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acylethanolamines. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1811**, 724–736 (2011).
241. Rago, B. & Fu, C. Development of a high-throughput ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to profile 18 eicosanoids as exploratory biomarkers for atherosclerotic diseases. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **936**, 25–32 (2013).
242. Song, J. *et al.* A highly efficient, high-throughput lipidomics platform for the quantitative detection of eicosanoids in human whole blood. *Anal. Biochem.* **433**, 181–188 (2013).
243. Huck, C. W. & Bonn, G. K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **885**, 51–72 (2000).
244. Poole, C. F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* **22**, 362–373 (2003).
245. Masqué, N., Marcé, R. M. & Borrull, F. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. *TrAC Trends Anal. Chem.* **17**, 384–394 (1998).

246. Zhao, Y.-Y., Wu, S.-P., Liu, S., Zhang, Y. & Lin, R.-C. Ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry as a sensitive and powerful technology in lipidomic applications. *Chem. Biol. Interact.* **220**, 181–192 (2014).
247. Buré, C., Ayciriex, S., Testet, E. & Schmitter, J.-M. A single run LC-MS/MS method for phospholipidomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 203–213 (2013).
248. Ayciriex, S. *et al.* Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 3049–3059 (2012).
249. Blewett, A. J., Varma, D., Gilles, T., Libonati, J. R. & Jansen, S. A. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry method for the simultaneous determination of 23 eicosanoids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**, 653–662 (2008).
250. Swartz, M. E. UPLC™: An Introduction and Review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **28**, 1253–1263 (2005).
251. Plumb, R. *et al.* Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **18**, 2331–2337 (2004).
252. Thomson, S. J. J. Rays of positive electricity. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* (2009). doi:10.1080/14786440208637024
253. Dole, M. *et al.* Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240–2249 (1968).
254. Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **280**, 383–397 (1964).
255. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287–2294 (1976).
256. Common Ionization : Waters. Available at:  
[http://www.waters.com/waters/fr\\_FR/Common-ionization/nav.htm?cid=10073251&local=fr\\_FR&locale=fr\\_FR](http://www.waters.com/waters/fr_FR/Common-ionization/nav.htm?cid=10073251&local=fr_FR&locale=fr_FR). (Accessed: 18th August 2016)

257. Baim, M. A., Eatherton, R. L. & Hill Jr, H. H. Ion mobility detector for gas chromatography with a direct photoionization source. *Anal. Chem.* **55**, 1761–1766 (1983).
258. Agilent | Atmospheric Pressure Photoionization Source. Available at: [http://www.agilent.com/en-us/products/mass-spectrometry/lc-ms-ion-sources/atmospheric-pressure-photoionization-source-\(appi\)/gp2294](http://www.agilent.com/en-us/products/mass-spectrometry/lc-ms-ion-sources/atmospheric-pressure-photoionization-source-(appi)/gp2294). (Accessed: 19th August 2016)
259. Marchi, I., Rudaz, S. & Veuthey, J.-L. Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: a review. *Talanta* **78**, 1–18 (2009).
260. Raffaelli, A. & Saba, A. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 318–331 (2003).
261. Robb, D. B. & Blades, M. W. State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. *Anal. Chim. Acta* **627**, 34–49 (2008).
262. Syage, J. A. Mechanism of  $[M + H]^+$  formation in photoionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1521–1533 (2004).
263. Song, L., Wellman, A. D., Yao, H. & Bartmess, J. E. Negative ion-atmospheric pressure photoionization: electron capture, dissociative electron capture, proton transfer, and anion attachment. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1789–1798 (2007).
264. Basso, E., Marotta, E., Seraglia, R., Tubaro, M. & Traldi, P. On the formation of negative ions in atmospheric pressure photoionization conditions. *J. Mass Spectrom. JMS* **38**, 1113–1115 (2003).
265. Kauppila, T. J., Kotiaho, T., Kostianen, R. & Bruins, A. P. Negative ion-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 203–211 (2004).
266. Xian, F., Hendrickson, C. L. & Marshall, A. G. High resolution mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 708–719 (2012).
267. Marshall, A. G. & Hendrickson, C. L. High-resolution mass spectrometers. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* **1**, 579–599 (2008).

268. Cours Spectrométrie de Masse Cours ESBS Oct 2010 Introduction Sarah CIANFERANI Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) Laboratoire de Spectrométrie. - ppt télécharger. Available at: <http://slideplayer.fr/slide/1557235/>. (Accessed: 22nd August 2016)
269. Paul, W. & Steinwedel, H. Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Z. Naturforschung Teil A* **8**, 448–450 (1953).
270. Dawson, P. H., French, J. B., Buckley, J. A., Douglas, D. J. & Simmons, D. The use of triple quadrupoles for sequential mass spectrometry: 1—The instrument parameters. *Org. Mass Spectrom.* **17**, 205–211 (1982).
271. Wiley, W. C. & McLaren, I. H. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **26**, 1150–1157 (1955).
272. Mamyrin, B. A., Karataev, V. I., Shmikk, D. V. & Zagulin, V. A. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. J. Exp. Theor. Phys.* **37**, 45 (1973).
273. Spectromètre de masse à temps de vol (TOF). *Spectrométrie de masse* (2016).
274. Chernushevich, I. V., Loboda, A. V. & Thomson, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. JMS* **36**, 849–865 (2001).
275. Morris, H. R. *et al.* High Sensitivity Collisionally-activated Decomposition Tandem Mass Spectrometry on a Novel Quadrupole/Orthogonal-acceleration Time-of-flight Mass Spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 889–896 (1996).
276. Han, X. & Gross, R. W. Shotgun lipidomics: multidimensional MS analysis of cellular lipidomes. *Expert Rev. Proteomics* **2**, 253–264 (2005).
277. Blanksby, S. J. & Mitchell, T. W. Advances in Mass Spectrometry for Lipidomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **3**, 433–465 (2010).
278. Li, M., Zhou, Z., Nie, H., Bai, Y. & Liu, H. Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 243–249 (2011).

279. Navas-Iglesias, N., Carrasco-Pancorbo, A. & Cuadros-Rodríguez, L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *TrAC Trends Anal. Chem.* **28**, 393–403 (2009).
280. Luan, H. *et al.* Non-targeted metabolomics and lipidomics LC–MS data from maternal plasma of 180 healthy pregnant women. *GigaScience* **4**, (2015).
281. Wenk, M. R. The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 594–610 (2005).
282. Taguchi, R. *et al.* Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **823**, 26–36 (2005).
283. German, J. B., Gillies, L. A., Smilowitz, J. T., Zivkovic, A. M. & Watkins, S. M. Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 66–71 (2007).
284. Harkewicz, R. & Dennis, E. A. Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 301–325 (2011).
285. Hu, C. *et al.* Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *J. Chromatogr. B* **877**, 2836–2846 (2009).
286. Dunn, W. B. *et al.* Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **6**, 1060–1083 (2011).
287. Want, E. J. *et al.* Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat. Protoc.* **8**, 17–32 (2013).
288. Kamleh, M. A., Ebbels, T. M. D., Spagou, K., Masson, P. & Want, E. J. Optimizing the use of quality control samples for signal drift correction in large-scale urine metabolic profiling studies. *Anal. Chem.* **84**, 2670–2677 (2012).
289. Croixmarie, V. *et al.* Integrated Comparison of Drug-Related and Drug-Induced Ultra Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Metabonomic Profiles Using Human Hepatocyte Cultures. *Anal. Chem.* **81**, 6061–6069 (2009).

290. van der Kloet, F. M., Bobeldijk, I., Verheij, E. R. & Jellema, R. H. Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping. *J. Proteome Res.* **8**, 5132–5141 (2009).
291. Zelena, E. *et al.* Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal. Chem.* **81**, 1357–1364 (2009).
292. Eliasson, M. *et al.* Strategy for Optimizing LC-MS Data Processing in Metabolomics: A Design of Experiments Approach. *Anal. Chem.* **84**, 6869–6876 (2012).
293. Smith, C. A., Want, E. J., O’Maille, G., Abagyan, R. & Siuzdak, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* **78**, 779–787 (2006).
294. Tautenhahn, R., Böttcher, C. & Neumann, S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* **9**, 504 (2008).
295. Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D. & Siuzdak, G. XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Anal. Chem.* **84**, 5035–5039 (2012).
296. Mahieu, N. G., Genenbacher, J. L. & Patti, G. J. A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **30**, 87–93 (2016).
297. Lange, E., Tautenhahn, R., Neumann, S. & Gröpl, C. Critical assessment of alignment procedures for LC-MS proteomics and metabolomics measurements. *BMC Bioinformatics* **9**, 375 (2008).
298. Shen, X. *et al.* Normalization and integration of large-scale metabolomics data using support vector regression. *Metabolomics* **12**, 89 (2016).
299. Bro, R. & Smilde, A. K. Centering and scaling in component analysis. *J. Chemom.* **17**, 16–33 (2003).
300. van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K. & van der Werf, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* **7**, 142 (2006).
301. Eriksson, L., Johansson, E., Kettapeh-Wold, S. & Wold, S. *Introduction to multi- and megavariate data analysis using projection methods (PCA & PLS)*. (Umetrics, 1999).

302. FDA guidance for industry : bioanalytical method validation. Available at:  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107>. (Accessed: 29th August 2016)
303. Bro, R. & K. Smilde, A. Principal component analysis. *Anal. Methods* **6**, 2812–2831 (2014).
304. Shlens, J. A tutorial on principal component analysis. *ArXiv Prepr. ArXiv14041100* (2014).
305. Wheelock, Å. M. & Wheelock, C. E. Trials and tribulations of ‘omics data analysis: assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine. *Mol. Biosyst.* **9**, 2589–2596 (2013).
306. Worley, B. & Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* **1**, 92–107 (2013).
307. Wold, S. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics* **20**, 397–405 (1978).
308. Worley, B. & Powers, R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. *Curr. Metabolomics* **4**, 97–103 (2016).
309. Ståhle, L. & Wold, S. Partial least squares analysis with cross-validation for the two-class problem: A Monte Carlo study. *J. Chemom.* **1**, 185–196 (1987).
310. Barker, M. & Rayens, W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* **17**, 166–173 (2003).
311. Eriksson, L., Trygg, J. & Wold, S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. *J. Chemom.* **22**, 594–600 (2008).
312. Esbensen, K. H. & Geladi, P. Principles of Proper Validation: use and abuse of re-sampling for validation. *J. Chemom.* **24**, 168–187 (2010).
313. Mahadevan, S., Shah, S. L., Marrie, T. J. & Slupsky, C. M. Analysis of Metabolomic Data Using Support Vector Machines. *Anal. Chem.* **80**, 7562–7570 (2008).

314. Triba, M. N. *et al.* PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Mol. Biosyst.* **11**, 13–19 (2014).
315. Trygg, J. & Wold, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* **16**, 119–128 (2002).
316. Wiklund, S. *et al.* Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Anal. Chem.* **80**, 115–122 (2008).
317. Lanzini, J. *et al.* Changing in lipid profile induced by the mutation of Foxn1 gene: A lipidomic analysis of Nude mice skin. *Biochimie* **118**, 234–243 (2015).
318. Orrù, G., Pettersson-Yeo, W., Marquand, A. F., Sartori, G. & Mechelli, A. Using Support Vector Machine to identify imaging biomarkers of neurological and psychiatric disease: A critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 1140–1152 (2012).
319. Pereira, F., Mitchell, T. & Botvinick, M. Machine learning classifiers and fMRI: a tutorial overview. *NeuroImage* **45**, S199-209 (2009).
320. Cortes, C. & Vapnik, V. Support-vector networks. *Mach. Learn.* **20**, 273–297
321. Luts, J. *et al.* A tutorial on support vector machine-based methods for classification problems in chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **665**, 129–145 (2010).
322. H Delacour, A. S. La courbe ROC (receiver operating characteristic): principes et principales applications en biologie clinique.
323. Thompson, M. L. & Zucchini, W. On the statistical analysis of ROC curves. *Stat. Med.* **8**, 1277–1290 (1989).
324. Bradley, A. P. The use of the area under the ROC curve in the evaluation of machine learning algorithms. *Pattern Recognit.* **30**, 1145–1159 (1997).
325. Fawcett, T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit. Lett.* **27**, 861–874 (2006).

326. Fay, M. P. & Proschan, M. A. Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Stat. Surv.* **4**, 1–39 (2010).
327. Hochberg, Y. & Benjamini, Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat. Med.* **9**, 811–818 (1990).
328. Wishart, D. S. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis* **3**, 1769–1782 (2011).
329. Smith, C. A. *et al.* METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther. Drug Monit.* **27**, 747–751 (2005).
330. Fahy, E., Sud, M., Cotter, D. & Subramaniam, S. LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res.* **35**, W606-612 (2007).
331. Wakx, A. *Etude de nouveaux biomarqueurs de toxicité induite par des micropolluants (benzo(a)pyrène et phtalate de bis(2-ethylhexyle)) sur des modèles de placenta humain.* (Paris 5, 2014).
332. Kato, K. *et al.* Quantitative Detection of Nine Phthalate Metabolites in Human Serum Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **27**, 284–289 (2003).
333. Takatori, S., Kitagawa, Y., Kitagawa, M., Nakazawa, H. & Hori, S. Determination of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **804**, 397–401 (2004).
334. Monfort, N., Ventura, R., Balcells, G. & Segura, J. Determination of five di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in urine by UPLC–MS/MS, markers of blood transfusion misuse in sports. *J. Chromatogr. B* **908**, 113–121 (2012).
335. Chang, Y.-J., Lin, K.-L. & Chang, Y.-Z. Determination of Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **420**, 155–159 (2013).
336. Silva, M. J. *et al.* Detection of phthalate metabolites in human saliva. *Arch. Toxicol.* **79**, 647–652 (2005).

337. Stanstrup, J., Gerlich, M., Dragsted, L. O. & Neumann, S. Metabolite profiling and beyond: approaches for the rapid processing and annotation of human blood serum mass spectrometry data. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 5037–5048 (2013).
338. Evans, R. M., Barish, G. D. & Wang, Y.-X. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* **10**, 355–361 (2004).
339. Joosen, A. M. C. P., Bakker, A. H. F., Kersten, S. & Westerterp, K. R. The PPARgamma ligand rosiglitazone influences triacylglycerol metabolism in non-obese males, without increasing the transcriptional activity of PPARgamma in the subcutaneous adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **99**, 487–493 (2008).
340. Nguyen, P. *et al.* Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **92**, 272–283 (2008).
341. Giudicelli, H., Combes-Pastré, N. & Boyer, J. Lipolytic activity of adipose tissue IV. The diacylglycerol lipase activity of human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **369**, 25–33 (1974).
342. Hegarty, B. D., Furler, S. M., Oakes, N. D., Kraegen, E. W. & Cooney, G. J. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activation induces tissue-specific effects on fatty acid uptake and metabolism in vivo--a study using the novel PPARalpha/gamma agonist tesaglitazar. *Endocrinology* **145**, 3158–3164 (2004).
343. Jin, Y., McFie, P. J., Banman, S. L., Brandt, C. & Stone, S. J. Diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) and monoacylglycerol acyltransferase-2 (MGAT2) interact to promote triacylglycerol synthesis. *J. Biol. Chem.* **289**, 28237–28248 (2014).
344. Bengtsson, G. & Olivecrona, T. Lipoprotein Lipase. *Eur. J. Biochem.* **106**, 557–562 (1980).
345. Fagone, P. & Jackowski, S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.* **50**, S311–S316 (2009).
346. R M Bell & Coleman, and R. A. Enzymes of Glycerolipid Synthesis in Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 459–487 (1980).

347. Xie, S., Naslavsky, N. & Caplan, S. Diacylglycerol kinases in membrane trafficking. *Cell. Logist.* **5**, e1078431 (2015).
348. Okazaki, T. *et al.* Diacylglycerol metabolism and arachidonic acid release in human fetal membranes and decidua vera. *J. Biol. Chem.* **256**, 7316–7321 (1981).
349. Matsuda, T., Imai, A. & Tamaya, T. Phospholipase C activity in human placental membrane. *Arch. Gynecol. Obstet.* **246**, 27–33 (1989).
350. McMaster, C. R. & Bell, R. M. CDP-ethanolamine:1,2-diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1348**, 117–123 (1997).
351. Wright, M. M. & McMaster, C. R. PC and PE synthesis: Mixed micellar analysis of the cholinephosphotransferase and ethanolaminephosphotransferase activities of human choline/ethanolamine phosphotransferase 1 (CEPT1). *Lipids* **37**, 663–672 (2002).
352. Shields, D. J., Lehner, R., Agellon, L. B. & Vance, D. E. Membrane Topography of Human Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **278**, 2956–2962 (2003).
353. Resseguie, M. *et al.* Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene expression is induced by estrogen in human and mouse primary hepatocytes. *FASEB J.* **21**, 2622–2632 (2007).
354. Vance, J. E. Thematic Review Series: Glycerolipids. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J. Lipid Res.* **49**, 1377–1387 (2008).
355. D'Arrigo, P. & Servi, S. Synthesis of Lysophospholipids. *Molecules* **15**, 1354–1377 (2010).
356. Chang, Y.-Y. & Kennedy, E. P. Phosphatidyl glycerophosphate phosphatase. *J. Lipid Res.* **8**, 456–462 (1967).
357. Bleasdale, J. E. & Johnston, J. M. CMP-Dependent incorporation of [<sup>14</sup>C]glycerol 3-phosphate into phosphatidylglycerol and phosphatidylglycerol phosphate by rabbit lung microsomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **710**, 377–390 (1982).

358. Braverman, N. E. & Moser, A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1822**, 1442–1452 (2012).
359. Nagan, N. & Zoeller, R. A. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res.* **40**, 199–229 (2001).
360. Maeba, R. *et al.* Plasmalogens in Human Serum Positively Correlate with High-Density Lipoprotein and Decrease with Aging. *J. Atheroscler. Thromb.* **14**, 12–18 (2007).
361. Hayashi, H. & Takahata, S. 'ichi. Role of peroxisomal fatty acyl-CoA  $\beta$ -oxidation in phospholipid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 326–331 (1991).
362. Holland, W. L. & Summers, S. A. Sphingolipids, Insulin Resistance, and Metabolic Disease: New Insights from in Vivo Manipulation of Sphingolipid Metabolism. *Endocr. Rev.* **29**, 381–402 (2008).
363. Reynolds, C. P., Maurer, B. J. & Kolesnick, R. N. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett.* **206**, 169–180 (2004).
364. Lahiri, S. & Futerman, A. H. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2270–2284 (2007).
365. Levy, M. & Futerman, A. H. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* **62**, 347–356 (2010).
366. Puyraimond-Zemmour, D. & Vignot, S. Le métabolisme de la cellule tumorale : l'effet Warburg. *Oncologie* **15**, 435–440 (2013).
367. Blaho, V. A., Buczynski, M. W., Brown, C. R. & Dennis, E. A. Lipidomic Analysis of Dynamic Eicosanoid Responses during the Induction and Resolution of Lyme Arthritis. *J. Biol. Chem.* **284**, 21599–21612 (2009).
368. Puppolo, M., Varma, D. & Jansen, S. A. A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue. *J. Chromatogr. B* **964**, 50–64 (2014).
369. Martin-Venegas, R., Jáuregui, O. & Moreno, J. J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of eicosanoids and related compounds in cell models. *J. Chromatogr. B* **964**, 41–49 (2014).

370. Medina, S. *et al.* A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **26**, 1249–1257 (2012).
371. Tarrade, A. *et al.* PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* **142**, 4504–4514 (2001).
372. Cetin, I., Parisi, F., Berti, C., Mandò, C. & Desoye, G. Placental fatty acid transport in maternal obesity. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **3**, 409–414 (2012).
373. Martínez, N. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation regulates lipid metabolism in the feto-placental unit from diabetic rats. *Reprod. Camb. Engl.* **136**, 95–103 (2008).
374. Schroepfer, G. J. Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361–554 (2000).
375. Olivier, E. *et al.* Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2016). doi:10.1016/j.jsbmb.2016.05.015
376. Olivier, E. *et al.* P2X7-pannexin-1 and amyloid  $\beta$ -induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-related macular degeneration? *Biochimie* **127**, 70–78 (2016).
377. Pataj, Z., Liebisch, G., Schmitz, G. & Matysik, S. Quantification of oxysterols in human plasma and red blood cells by liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1439**, 82–88 (2016).
378. Roberg-Larsen, H. *et al.* Highly automated nano-LC/MS-based approach for thousand cell-scale quantification of side chain-hydroxylated oxysterols. *J. Lipid Res.* **55**, 1531–1536 (2014).
379. Dyer, R. G. *et al.* 7-ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **260**, 1–13 (1997).

380. Zarev, S. *et al.* Extent of copper LDL oxidation depends on oxidation time and copper/LDL ratio: chemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**, 68–78 (2003).
381. Wadsack, C. *et al.* Trophoblast-like human choriocarcinoma cells serve as a suitable in vitro model for selective cholesteryl ester uptake from high density lipoproteins. *Eur. J. Biochem.* **270**, 451–462 (2003).
382. Simpson, E. R., Bilheimer, D. W., MacDonald, P. C. & Porter, J. C. Uptake and degradation of plasma lipoproteins by human choriocarcinoma cells in culture. *Endocrinology* **104**, 8–16 (1979).
383. Pavan, L. *et al.* Lipids from Oxidized Low-Density Lipoprotein Modulate Human Trophoblast Invasion: Involvement of Nuclear Liver X Receptors. *Endocrinology* **145**, 4583–4591 (2004).
384. Pavan, L. *et al.* Oxidized low-density lipoproteins inhibit trophoblastic cell invasion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 1969–1972 (2004).
385. Quinn, C. M., Jessup, W., Wong, J., Kritharides, L. & Brown, A. J. Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands. *Biochem. J.* **385**, 823–830 (2005).
386. Duan, Y. *et al.* Peroxisome Proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation by ligands and dephosphorylation induces proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and low density lipoprotein receptor expression. *J. Biol. Chem.* **287**, 23667–23677 (2012).
387. Mozzicafreddo, M. *et al.* Environmental pollutants directly affect the liver X receptor alpha activity: Kinetic and thermodynamic characterization of binding. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **152**, 1–7 (2015).
388. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
389. Chomczynski, P. & Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**, 581–585 (2006).

390. Pasmant, E. *et al.* Identification of genes potentially involved in the increased risk of malignancy in NF1-microdeleted patients. *Mol. Med. Camb. Mass* **17**, 79–87 (2011).
391. Dennis, E. A. in *The Enzymes* (ed. Boyer, P. D.) **16**, 307–353 (Academic Press, 1983).

# Valorisations scientifiques



## Travaux en soumissions

*Lipidome-wide disturbances of JEG-3 cells by MEHP activation of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$*

J. Petit, A. Wakx, S. Gil, T. Fournier, N. Auzeil, P. Rat, O. Laprévotte

Soumis dans *Journal of Lipid Research*

## Présentations orales

Biomarqueurs d'exposition placentaire aux phtalates : effet du MEHP sur le lipidome des cellules JEG-3

J. Petit, N. Auzeil, O. Laprévotte

Journée scientifique de la faculté, Paris, février 2016

Perturbation du profil lipidique induite par la présence de MEHP : analyse lipidomique de cellules placentaires JEG-3

J. Petit, N. Auzeil, O. Laprévotte

Club jeune de la SFSM, Montélimar, mars 2015

Autopsie analytique de la perturbation métabolique des cellules placentaires par des polluants environnementaux ligands de PPAR $\gamma$

J. Petit, N. Auzeil, O. Laprévotte

Journée du DIM analytics, ESPCI, décembre 2014

Perturbation du profil lipidique induite par la présence de MEHP : analyse lipidomique d'une lignée cellulaire JEG-3

J. Petit, N. Auzeil, O. Laprévotte

Congrès SFSM-SMAP , Lyon, juin 2014

## Présentations posters

Biomarqueurs d'exposition placentaire aux phtalates : effet du MEHP sur le lipidome des cellules JEG-3

J. Petit, A. Regazzetti, N. Auzeil, O. Laprévotte

Journée du DIM analytics, ESPCI, janvier 2016

Perturbation du profil lipidique des cellules JEG-3 induite par la présence de MEHP

J. Petit, N. Oussedik, N. Auzeil, O. Laprévôte

Congrès SEP, Paris, avril 2015

Perturbation du profil lipidique des cellules JEG-3 induite par la présence de MEHP

J. Petit, N. Oussedik, N. Auzeil, O. Laprévôte

Journées scientifiques de l'ED MTCI, Paris, mai 2015