



**HAL**  
open science

# Lipidomique des eicosanoïdes en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse dans le cadre de l'athérosclérose

Kodjo Nouwade

► **To cite this version:**

Kodjo Nouwade. Lipidomique des eicosanoïdes en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse dans le cadre de l'athérosclérose. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASF037 . tel-04689989

**HAL Id: tel-04689989**

**<https://theses.hal.science/tel-04689989v1>**

Submitted on 6 Sep 2024

**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.

# Lipidomique des eicosanoïdes en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse dans le cadre de l'athérosclérose

*Lipidomics of eicosanoids in liquid chromatography coupled to mass spectrometry in the context of atherosclerosis*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571 Sciences chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes, 2MIB  
Spécialité de doctorat : Chimie  
Graduate School : Chimie. Référent : Faculté Des Sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'**Unité interdisciplinaire Lipides : systèmes analytiques et biologiques (Université Paris-Saclay)**, sous la direction du **Pr Pierre CHAMINADE**, Professeur des Universités, le co-encadrement de **Sana TFAILLI**, Maître de Conférences des Universités

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 30 mai 2022, par

**Kodjo NOUWADE**

## Composition du Jury

<b>Igor CLAROT</b> Professeur des Universités, Université de Lorraine	Président
<b>Nathalie DELAUNAY</b> Chargée de recherche-HDR, ESPCI Paris	Rapporteuse & Examinatrice
<b>Estelle PUJOS-GUILLOT</b> Ingénieure de recherche, HDR, INRAe, Université de Clermont Auvergne	Rapporteuse & Examinatrice
<b>François FENAILLE</b> Ingénieur-Chercheur, HDR, CEA Paris-Saclay	Examineur
<b>Pierre CHAMINADE</b> Professeur des Universités, Directeur de l'Unité Lip(Sys) <sup>2</sup> , Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

# Remerciements

Au terme de cette aventure doctorale, je voudrais d'abord rendre gloire à Dieu le très Miséricordieux, et lui dire Merci, lui qui permet toute chose !!!

Je tiens à présenter mes remerciements au Docteur Nathalie DELAUNAY ainsi qu'au Docteur Estelle PUJOS-GUILLOT pour avoir accepté de juger la qualité de mes travaux de thèse en tant que rapporteurs, malgré leur agenda sans doute chargé.

Un grand merci au Professeur Igor CLAROT d'avoir accepté d'examiner ces travaux. Merci pour le temps consacré pour cette tâche.

Au Docteur François FENAILLE, je vous dis merci d'avoir accepté d'examiner mes travaux. Je vous remercie également de m'avoir accompagné pendant ces trois années de thèse en tant que membre externe du comité de thèse. Merci d'avoir fait de ce cadre, un moment d'échanges scientifique de haute qualité. Votre esprit critique et vos questions ont permis d'apporter une touche particulière à ce travail de thèse et l'ouvrir vers d'autres explorations scientifiques dans le but de répondre à certains questionnements de ce travail.

Je remercie plus particulièrement le Professeur Pierre CHAMINADE pour avoir dirigé ces travaux de thèse. Votre encadrement méthodologique, vos orientations scientifiques et votre disponibilité nous ont permis de mener à bien nos travaux. Votre franchise sans hypocrisie aucune sur le plan scientifique et humain ont fait de moi, celui que je suis devenu. Et je ne peux qu'être ravi d'avoir été formé par l'un des meilleurs spécialistes en Chromatographie et techniques séparatives en France.

Mes remerciements vont également au Docteur Sana TFAILI pour avoir accepté d'encadrer cette thèse. Merci pour votre accompagnement au quotidien, votre recherche de solution à toutes les difficultés qui se présentaient au cours de cette thèse, votre disponibilité et votre aide au traitement de données et à la rédaction d'articles. Votre esprit de synthèse et votre engagement ont permis d'améliorer nos stratégies et d'apporter une touche particulière à notre travail. Je vous exprime ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur Jean-Louis PAUL et le Docteur Natalie FOURNIER pour leur encadrement pendant cette aventure à l'interface chimie-biologie. Votre esprit critique en bibliographie, votre disponibilité pour les choix méthodologiques ainsi que

vos conseils nous ont permis d'avancer efficacement dans nos expérimentations. Aussi vos remises en question pendant nos présentations ont permis d'aiguiser notre rigueur dans l'interprétation scientifique de nos résultats cellulaires. Soyez-en remerciés au travers de ces mots.

A vous Docteur Audrey SOLGADI, Docteur Danielle LIBONG et Monsieur Bastien PROST, je vous témoigne ma profonde gratitude pour la formation et l'accompagnement pendant le développement en spectrométrie de masse à la plateforme SAMM (Service d'Analyse Des Médicaments et Métabolites). Votre disponibilité, votre bonne humeur et vos orientations nous ont été d'une aide précieuse pour l'aboutissement des objectifs en spectrométrie de masse. Je tiens à vous témoigner ma sincère et profonde reconnaissance.

Au Docteur Nicolas TAUDON et Madame Sandrine LIVET, merci pour la disponibilité et pour m'avoir donné l'opportunité de passer au sein de votre unité de recherche à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées pour effectuer des analyses complémentaires à notre travail de thèse.

Merci au Professeur Alain TCHAPLA et au Docteur Sylvie HERON au LETIAM de l'Institut de Chimie Physique pour, notamment, le prêt de phases stationnaires. Je voudrais dire un sincère merci au Professeur Alain TCHAPLA pour sa disponibilité lors de nos échanges sur les considérations en termes de sélectivité des phases stationnaires. Ce fut un réel plaisir pour moi de profiter de votre bibliothèque intellectuelle très riche et inépuisable.

Je voudrais aussi remercier et dédicacer ce travail au Professeur Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA et au Docteur Serge MICHALET qui ont cru en moi en m'ouvrant les portes de la recherche pour la première fois en France. Je vous serai à jamais reconnaissant. En réalité, c'est de vous que vient l'origine de mon tropisme pour la chimie analytique appliquée aux problématiques omiques. Merci pour tout ceci.

A tous mes collègues Joudi, Sonia, Aline, Laura, Antoine, Hani et Ali ainsi qu'à tous les membres de l'unité interdisciplinaire Lip(Sys)<sup>2</sup>, merci pour le soutien et merci d'avoir embelli cette aventure au travers de divers moments de convivialités et d'échanges. Merci Sonia pour les échanges de diverses natures qui étaient des plus sympathiques et scientifiques. Merci Hani pour ta disponibilité et ta flexibilité pendant nos manip de culture cellulaire et pour l'aide apportée.



A Martin SOUCE, je te dis toute ma gratitude pour ta rapidité dans le traitement de mes commandes urgentes de standards, ta disponibilité à chaque besoin et pour tous nos échanges. Ta sympathie de tous les jours m'a été d'un grand réconfort moral.

A toute ma famille, notamment à ma grande mère Konkui, à mes parents feu père Komla et feu mère Bernice et à mon grand frère le Révérend Père Thierry, je vous témoigne ici toute ma reconnaissance et vous dédie ce travail comme fruit de vos efforts dès mes premiers pas à l'école. Plus particulièrement à toi Maman, je te remercie pour t'être sacrifiée pour moi, pour l'esprit ambitieux qui résonne toujours dans mes oreilles et pour l'éducation très dure que tu m'as inculquée et qui m'accompagne au quotidien face à chaque situation de la vie. Merci Merci Merci infiniment Maman, je t'aime !

Un grand merci à mon épouse Honorine et mon fils Primaël Yanis. Votre amour et votre soutien étaient les grands piliers de la motivation qui m'a permis de mener à bien ce projet. Merci pour avoir su supporter mes longues périodes d'indisponibilités et de sauts d'humeur classiques d'une thèse d'Université.

A ma marraine Valérie et mes amis Gérard, Alain, Edouard, Daniel, Marco, je vous exprime ma profonde gratitude pour le soutien de tout genre. Merci Daniel pour ton soutien sans faille, tes mots de réconfort et tes conseils pendant les périodes compliquées de cette thèse ont été d'une aide indescriptible pour mener à bien ce projet.

Enfin, à l'ensemble des personnes durant ces années de thèse, merci pour tout !!! Et permettez-moi de personnaliser cette citation de Jean D'Ormesson pour vous dire ceci : Merci pour les roses durant cette aventure de thèse, et merci pour les épines qui m'ont permis de grandir davantage !!!

# Résumé

Mots clés : Lipidomique, Eicosanoïdes, Chromatographie liquide, Spectrométrie de masse, Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie immuno-inflammatoire multifactorielle aboutissant à une réduction de la lumière des artères due notamment au dépôt de lipides et de macrophages gorgés de cholestérol. La seule possibilité qu'ont ces cellules de se débarrasser du cholestérol en excès est de le céder à des accepteurs extracellulaires. Cet efflux du cholestérol est la première étape du transport inverse du cholestérol qui rapporte le cholestérol au foie, le seul organe capable de le dégrader. Des travaux récents dans l'unité interdisciplinaire Lip(Sys)<sup>2</sup> ont permis de montrer que des modifications chroniques de la composition en acides gras (AG) des phospholipides de la membrane des macrophages J774 et THP-1 par incorporation d'AG polyinsaturés, influencent la variation de l'efflux du cholestérol et semblent également dépendre de la lignée cellulaire. Parmi les pistes d'explorations du mécanisme moteur de cette variation d'efflux sont évoqués les eicosanoïdes qui impacteraient la phosphorylation des résidus sérine de la protéine d'efflux ABCA1 et modifieraient son fonctionnement. Les eicosanoïdes sont des molécules structurellement complexes, avec de nombreuses fonctions labiles. Leur détection et leur quantification constituent un défi du fait qu'elles sont présentes à l'état de trace dans les matrices biologiques. L'objectif de cette étude est de développer des méthodes en chromatographie liquide et en spectrométrie de masse pour la quantification des eicosanoïdes dans des modèles de macrophages (J774 et THP-1) dans différentes conditions inflammatoires mimant l'athérosclérose.

La séparation chromatographique a été développée sur sept colonnes sélectionnées sur la base du modèle de soustraction hydrophobe. Une comparaison des performances chromatographiques en RP-HPLC via différents descripteurs a révélé que Accucore C30 semble appropriée pour la séparation des isomères et isobares d'eicosanoïdes. La méthode en RP-HPLC couplée au LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA (Data Dependent Acquisition) a permis d'analyser l'ensemble des eicosanoïdes. Une segmentation du profil chromatographique et une optimisation des énergies de collision par HCD pour chaque eicosanoïde ont permis d'augmenter significativement la fréquence d'acquisition et le seuil de détection : de l'ordre de 2 pg pour quelques prostanoïdes et de 0.02 à 2 pg pour certains leucotriènes et espèces oxydées. Cette approche constitue une alternative à la détection des eicosanoïdes sur un spectromètre de masse en mode MRM. Cette nouvelle méthode a permis de suivre spécifiquement environ 24 eicosanoïdes et d'identifier des espèces sécrétées par les macrophages J774 et THP-1. Les profils quantitatif et qualitatif montrent une variation des eicosanoïdes dépendant

du type cellulaire et du temps de stimulation. Une corrélation entre l'efflux du cholestérol et la variation entre les différentes familles d'eicosanoïdes a été mise en lumière au travers de quatre potentiels biomarqueurs, offrant ainsi des pistes pour la compréhension du développement de l'athérosclérose.

# Abstract

Keywords: Lipidomic, Eicosanoids, Liquid Chromatography, Mass Spectrometry, Atherosclerosis

Atherosclerosis is a multifactorial immuno-inflammatory disease leading to a reduction of the arteries lumen due to the lipid and foam macrophages deposit. The only way to remove the excess accumulated cholesterol from foam macrophages is to transfer it to extracellular acceptors. This cholesterol efflux is the first step of the reverse cholesterol transport pathway that delivers cholesterol to the liver, the sole organ able to break it down. Recent work in the interdisciplinary unit Lip(Sys)<sup>2</sup> has shown chronic modifications of the phospholipids fatty acid (FA) composition in the membrane of J774 and THP-1 macrophages by incorporating polyunsaturated FAs influence the cholesterol efflux variation and would depend on the cell line. Among the driving mechanism of this efflux variation, eicosanoids would impact the serine residues phosphorylation of the ABCA1 efflux protein and affect its function. Eicosanoids are structurally complex molecules with many labile functions. Their detection and quantification are challenging because they are present at trace amounts in biological matrices. This study aims to develop liquid chromatography-mass spectrometry methods to quantify eicosanoids in macrophage models (J774 and THP-1) under different inflammatory conditions to mimic atherosclerosis.

We developed chromatographic separation on seven columns based on the hydrophobic subtraction model. A comparison of the chromatographic performance in RP-HPLC through different descriptors revealed Accucore C30 as suitable for the eicosanoids' isomers and isobars separation. RP-HPLC method coupled to LTQ-Orbitrap® Velos Pro in DDA (Data Dependent Acquisition) mode permitted to monitor all eicosanoids of the study. A segmentation of the chromatographic profile and optimization of the collision energies by HCD for each eicosanoid increased the acquisition frequency significantly and the detection threshold: around 2 pg for some prostanoids and 0.02-2 pg for some leukotrienes and oxidized species. Thus, this approach constitutes an alternative for eicosanoids detection on Mass Spectrometry in MRM mode. This novel method monitored 24 eicosanoids and identified species released by J774 and THP-1 macrophages. The quantitative and qualitative profiles exhibited eicosanoids fluctuations depending on the cell type and the stimulation time. A correlation between cholesterol efflux and different eicosanoid families was highlighted through four potential biomarkers, thus offering leads for the understanding of atherosclerosis development.

# Table des matières

Remerciements .....	2
Résumé .....	5
Abstract.....	7
Table des matières .....	8
Liste des figures.....	19
Liste des tableaux .....	24
Abréviations.....	25
Préambule .....	30
Partie I: De la compréhension du développement de l'athérosclérose à l'analyse de médiateurs lipidiques .....	33
Chapitre 1: L'athérosclérose.....	34
I. Définition .....	35
II. Genèse de la plaque d'athérome .....	35
1. La formation des cellules spumeuses .....	35
2. Les stries lipidiques .....	36
3. Formation de la plaque mature .....	36
4. Les diverses voies de transport plasmatiques du cholestérol .....	37
III. L'efflux du cholestérol .....	37
1. Régulation du cholestérol cellulaire .....	37
2. Les voies d'efflux du cholestérol.....	40
2.1. La diffusion aqueuse non spécifique .....	41
2.2. L'efflux de cholestérol libre médié par le récepteur SR-BI .....	41
2.3. Les transporteurs ABC .....	42
IV. Problématique biologique de l'étude.....	43
Chapitre 2: Des lipides à la lipidomique .....	47

I. Les fonctions biologiques des lipides.....	48
1. Rôle énergétique .....	48
2. Rôle structural.....	49
3. Rôle fonctionnel .....	50
II. Classification des lipides.....	50
1. Les glycérophospholipides .....	50
2. Les acides gras .....	52
III. Les eicosanoïdes .....	52
1. Généralités .....	52
2. Fonctions biologiques des eicosanoïdes .....	53
3. Mécanisme d'action des eicosanoïdes .....	55
4. Nomenclature.....	56
4.1. Les prostaglandines .....	56
4.2. Les prostacyclines.....	56
4.3. Les Thromboxanes .....	56
4.4. Les leucotriènes .....	57
5. Voies de biogenèse .....	58
5.1. La voie des cyclooxygénases :.....	58
5.2. La voie des lipoxygénases .....	61
5.3. La voie du cytochrome P450 .....	64
6. Stratégies de stimulation pour la production d'eicosanoïdes .....	64
6.1. Voie stimulée par les inducteurs du flux calcique intracellulaire.....	64
6.2. Voie déclenchée par l'action des endotoxines.....	66
IV. La lipidomique .....	68
1. Historique et considérations générales .....	68
Chapitre 3: Les méthodes d'analyse des eicosanoïdes .....	71

I. Historique et évolution dans l'analyse des eicosanoïdes.....	72
II. Les techniques de préparation d'échantillons .....	73
1. La chromatographie par immuno-affinité.....	73
2. L'extraction liquide-liquide .....	74
3. L'extraction en phase solide ou SPE .....	76
III. La chromatographie gazeuse pour l'analyse des eicosanoïdes .....	85
IV. La chromatographie liquide pour l'analyse des eicosanoïdes .....	86
1. La chromatographie liquide à polarité de phases normale .....	86
2. La chromatographie liquide à polarité de phases inversée .....	87
2.1. Nature-chimie des silanols.....	88
2.2. Les différents types de greffage.....	89
2.3. D'une phase stationnaire HPLC vers une phase de type UHPLC .....	92
2.4. Les critères de descriptions des performances chromatographiques des phases stationnaires .....	96
2.4.1. Les paramètres caractérisant la rétention.....	96
2.4.2. Les paramètres liés à l'efficacité d'une colonne chromatographique .....	97
2.4.3. Les paramètres liés à la séparation .....	100
2.4.3.1. Le facteur de séparation ou sélectivité entre deux pics .....	100
2.4.3.2. Système de sélection de colonnes.....	101
2.4.3.2.1. Le modèle de solvatation dans la rétention en RP-HPLC [205].....	102
2.4.3.2.2. Le modèle de soustraction hydrophobe .....	103
2.4.3.3. La résolution .....	105
2.4.4. La capacité de pic d'une colonne chromatographique .....	108
2.4.5. Autres critères d'optimisation de la séparation .....	110
2.5. La phase mobile.....	111
3. La chromatographie en fluide supercritique pour l'analyse des eicosanoïdes .....	116
V. Les détecteurs pour l'analyse des eicosanoïdes .....	116

1. Le détecteur d'aérosols chargés (Corona® CAD).....	117
1.1. Principe de fonctionnement du Corona® CAD.....	117
1.1.1. La nébulisation de l'effluent chromatographique.....	118
1.1.2. L'évaporation de la phase mobile.....	118
1.1.3. L'ionisation des particules par l'intermédiaire d'un gaz inerte ionisé par la décharge corona.....	119
1.1.4. La détection .....	119
2. La spectrométrie de masse.....	119
2.1. Principe général de fonctionnement d'un spectromètre de masse.....	119
2.1.1. Les techniques d'ionisation .....	120
2.1.1.1. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) .....	120
2.1.1.2. L'ionisation par electrospray des eicosanoïdes .....	121
2.1.2. Les analyseurs.....	123
2.1.2.1. Le quadripôle .....	126
2.1.2.2. Le triple quadripôle (QqQ) .....	127
2.1.2.3. Le spectromètre de masse en tandem de type quadripôle-temps de vol.....	129
2.1.2.4. Le LTQ-Orbitrap® Velos Pro .....	131
2.1.2.4.1. Différentes stratégies d'acquisitions en spectrométrie de masse pour la quantification des eicosanoïdes. ....	135
Le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) .....	136
Le mode SIM (Single Ion Monitoring).....	136
Le mode Data Dependent Acquisition (DDA) .....	136
Le mode Data Independent Acquisition (DIA) .....	138
2.1.3. Le détecteur .....	138
3. Autres détecteurs pour l'analyse des eicosanoïdes.....	138
VI. Problématique liée à l'analyse des eicosanoïdes.....	139



Partie II: Travaux expérimentaux-Développement de méthodes séparatives et de détection pour l'analyse des eicosanoïdes cellulaires.....	142
Chapitre 1: Développement de méthodes de séparation des eicosanoïdes par chromatographie liquide à polarité de phases inversée .....	143
I. Matériel et Méthodes.....	144
1. Matériel.....	144
1.1. Solvants et standards .....	144
1.2. Les phases stationnaires.....	151
1.3. Préparation des échantillons .....	153
2. Méthodes : conditions chromatographiques .....	153
II. Résultats et Discussion .....	154
1. Le modèle de soustraction hydrophobe (HSM) pour le choix des phases stationnaires .....	154
2. Choix des eicosanoïdes dans le contexte « athérosclérose » .....	160
3. Comparaison des performances chromatographiques de sept phases stationnaires en mode isocratique.....	160
3.1. Analyse du profil de séparation du mélange 1 sur les sept phases stationnaires..	160
3.2. Evaluation du facteur de rétention des phases stationnaires en mode isocratique	161
3.3. Evaluation de l'efficacité des phases stationnaires.....	162
3.4. Evaluation de la sélectivité des sept phases stationnaires en mode isocratique ...	164
4. Comparaison des performances chromatographiques de phases stationnaires à polarité de phases inversée en mode gradient.....	165
4.1. Evaluation des capacités de rétention des phases stationnaires.....	165
4.1.1. Analyse en mode gradient linéaire .....	165
4.1.2. Analyse en mode gradient optimisé.....	166
4.2. Evaluation de l'efficacité apparente des huit phases stationnaires en mode gradient linéaire .....	167

4.3. Comparaison des phases stationnaires par des critères d'optimisation de la sélectivité.....	169
4.3.1. L'évaluation de la sélectivité de séparation des eicosanoïdes.....	169
4.3.2. La capacité de pic (Pc).....	173
4.3.3. Le time needed (T <sub>NE</sub> ).....	174
4.4. Comparaison des meilleurs profils chromatographiques des sept phases stationnaires à polarité de phases inversée .....	175
4.5. Evaluation de l'impact du pH et de la température sur la séparation des eicosanoïdes .....	179
4.5.1. Evaluation de l'influence du pH.....	179
4.5.2. Evaluation de la température .....	180
4.6. Effet de l'acétonitrile et du méthanol sur la séparation des eicosanoïdes .....	182
Conclusion.....	184
Chapitre 2: Analyse des eicosanoïdes en Chromatographie à polarité de phases normale .....	187
I. Matériel et Méthodes.....	188
1. Matériel.....	188
1.1. Solvants et Standards.....	188
1.2. Les phases stationnaires testées .....	188
1.3. La préparation des échantillons .....	189
2. Méthodologie en NP-HPLC .....	189
II. Résultats et discussion .....	190
1. Développement d'une méthode de séparation des eicosanoïdes sur Kinetex .....	190
1.1. Optimisation de la phase mobile .....	190
1.2. Comparaison de profils d'eicosanoïdes en gradient linéaire et gradient optimisé .....	191
2. Développement de la séparation des eicosanoïdes sur Luna NH2 .....	192
2.1. Optimisation de la phase mobile .....	192

2.2. Comparaison des profils des eicosanoïdes en mode gradient linéaire et gradient optimisé .....	194
3. Développement et optimisation de la séparation en NP-HPLC sur Nucleosil .....	195
4. Développement et optimisation de la séparation en NP-HPLC sur Hypersil Gold™ CN .....	196
5. Comparaison des profils de séparation d'eicosanoïdes obtenus sur les 4 phases stationnaires. ....	198
Conclusion .....	200
Chapitre 3: Développement de méthodes de détection par spectrométrie de masse .....	202
I. Développement d'une méthode de détection sur un LTQ-Orbitrap® Velos Pro.....	203
1. Choix du mode d'ionisation .....	203
2. Les paramètres de source d'ionisation ESI.....	204
3. Le mode SRM pour le suivi des transitions des eicosanoïdes .....	205
3.1. Optimisation de l'énergie de collision et choix des transitions à suivre .....	205
3.2. Optimisation de la fréquence d'acquisition sur la trappe ionique .....	206
4. Développement d'une méthode d'analyse des eicosanoïdes par DDA .....	209
4.1. Optimisation de l'énergie de fragmentation par HCD.....	209
4.2. Le mode DDA pour le suivi des eicosanoïdes.....	216
5. Validation de la méthode .....	221
5.1. La sélectivité et la limite de détection .....	221
5.1.1. La sélectivité.....	221
5.1.2. La limite de détection et la limite de quantification .....	221
5.2. Domaine de linéarité.....	222
5.3. L'exactitude et la précision.....	224
II. Autres méthodes mises en œuvre pour le suivi des oxylipines.....	227
1. Développement d'une méthode de détection des eicosanoïdes sur le LCMS-8060 en mode MRM.....	227

2. Méthode d'analyse d'oxylipines sur le LCMS-8060 en mode SRM.....	228
Conclusion .....	229
Chapitre 4: Développement d'une méthode d'extraction des oxylipines.....	231
I. Matériel et Méthodologie globale .....	232
II. Optimisation de la phase de lavage.....	235
III. L'élution .....	237
1. Optimisation du solvant d'élution .....	237
2. Comparaison des rendements d'extraction des protocoles optimisés .....	239
IV. Etude de l'influence de la matrice et du pH sur l'extraction.....	243
1. Etude de l'effet de matrice sur le rendement d'extraction.....	243
2. Influence du pH sur le rendement d'extraction .....	244
V. L'extraction par SPE et l'extraction liquide liquide pour l'analyse des eicosanoïdes....	246
Conclusion .....	248
Chapitre 5: Applications des méthodes développées sur des modèles cellulaires .....	249
I. Profilage des eicosanoïdes relargués par des lignées cellulaires J774 et THP-1 .....	250
1. Matériel et Méthodes .....	250
1.1. Culture des lignées cellulaires J774 et THP-1 .....	250
1.2. Stimulation par le LPS.....	251
1.3. Prétraitement et extraction par SPE des surnageants.....	251
2. Analyse des eicosanoïdes cellulaires par les deux méthodes développées avec Accucore™ C30 sur les deux spectromètres de masse (LTQ-Orbitrap® Velos Pro et LCMS-8060).....	252
2.1. Caractérisation des médiateurs lipidiques par approche ciblée .....	252
2.2. Analyse qualitative du profil des oxylipines des macrophages J774 et THP-1 (LTQ- Orbitrap® Velos Pro) .....	254
2.3. Analyse comparative du profil global en eicosanoïdes des macrophages J774 et THP-1 .....	255

II. Analyse quantitative des eicosanoïdes produits par les macrophages J774 et THP-1	262
1. Matériel et Méthodes	262
1.1. Matériel	262
1.2. Méthodes	262
1.2.1. Mesure de l'efflux du cholestérol	262
1.2.2. Dosage d'eicosanoïdes de surnageants cellulaires	263
2. Résultats et Discussion	264
2.1. Evaluation de l'efflux du cholestérol sur deux modèles de macrophages : J774 et THP-1	264
2.2. Analyse quantitative des eicosanoïdes produits par les macrophages J774 et THP-1 non surchargés en cholestérol	265
Conclusion	269
Partie III: Discussion et conclusion générale	271
Références bibliographiques	280
ANNEXES	304
I. Développement de méthodes en RP-HPLC	305
1. Gradient linéaire évalué sur les 7 phases stationnaires	305
2. Gradient optimisé pour chaque phase stationnaire	306
3. Composition de la phase mobile pour tout le développement en RP-HPLC	307
4. Chromatogrammes de l'analyse en mode isocratique d'un mélange de cinq acides gras polyinsaturés sur les huit phases stationnaires	308
5. Résumé de TNE et la capacité de pic par minute pour l'ensemble des phases stationnaires	310
6. Tableau des valeurs de $F_s$ calculé pour les sept phases stationnaires et certaines utilisées en littérature	311
7. Effet du changement de phase organique sur la séparation des HETEs sur Accucore™ C30	312

8. Evaluation de l'effet de la phase organique sur la rétention des eicosanoïdes sur Accucore™ C30. ....	313
II. Développement en chromatographie liquide à polarité de phases normale.....	314
1. Profil de séparation des eicosanoïdes sur Luna NH2 avec une phase mobile à base d'isooctane, méthanol et d'acétate d'éthyle.....	314
III. Spectrométrie de masse .....	315
1. Optimisation de l'énergie de fragmentation par CID .....	315
2. Evaluation de la sensibilité au cours du développement sur la trappe ionique .....	320
3. Illustration de la segmentation du profil chromatographique pour analyse par le LTQ en mode SRM.....	321
4. Spectre de fragmentation à l'énergie optimale de chaque standard par HCD SUR LE ltq-Orbitrap® Velos Pro.....	322
5. Illustration de la segmentation du profil chromatographique pour analyse par le LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA avec segmentation du profil chromatographique..	329
6. Comparaison de l'acquisition en mode DDA sans segmentation et avec segmentation du profil LC par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) .....	330
7. Evaluation de la sélectivité de la méthode RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) en mode DDA .....	331
8. Courbes d'étalonnage pour la quantification des eicosanoïdes .....	333
9. Paramètres d'optimisation de source, de fragmentation et les transitions sur la LCMS-8060 .....	338
IV. Développement d'une méthode d'extraction par SPE .....	339
1. Module VacMaster-10 utilisé dans l'étude.....	339
2. Tableau récapitulatif de l'optimisation de trois facteurs qui influencent le rendement d'extraction.....	340
3. Rendements réels par molécule et par cartouche suivant leur protocole optimisé.....	341
4. Evaluation de l'effet de matrice (%) sur le rendement d'extraction présenté en Annexe IV-3.....	343

5. Protocoles d'extraction suivant Folch et Bligh – Dyer modifié .....	344
6. Evaluation des performances d'extraction d'eicosanoïdes.....	345
V. Applications des méthodes développées sur des modèles cellulaires .....	346
1. Plan de plaque pour l'expérience de stimulation des cellules pour un profilage en eicosanoïdes.....	346
2. Spectre de fragmentation de la molécule inconnue de m/z de 319.23 produit par les deux lignées de macrophages .....	347
3. Récapitulatif des eicosanoïdes cellulaires et exactitude sur leur masse moléculaire ..	348
4. Profilage global en prostanoides des macrophages J774 et THP-1 stimulés ou non par le LPS (Analyse par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro).....	349
5. Profilage des espèces oxydées des macrophages J774 et THP-1 stimulés ou non par le LPS (Analyse par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro).....	350
6. Evaluation de l'efflux du cholestérol de macrophages THP-1 et J774 non surchargés en cholestérol.....	351
7. Voie de biogenèse des eicosanoïdes produits par les macrophages THP-1 et J774 suivant différentes conditions de traitement .....	352
8. Loading plot obtenu par régression des moindres carrés partiels appliquée aux oxylipines (variables X) et à l'efflux du cholestérol (variable Y).....	353
VI. Publication et communications .....	354
1. Publication.....	354
2. Communications Orales .....	354
3. Communications par voie d'affiches .....	355

# Liste des figures

Figure 1: Schéma montrant les mécanismes de régulation du cholestérol dans une cellule [5]....	40
Figure 2: Organisation de la membrane plasmique selon un modèle de Singer et Nicolson [56]	49
Figure 3 : Principales caractéristiques structurales des glycérophospholipides des membranes cellulaires.....	51
Figure 4: Nomenclature des prostanoïdes montrant la variation du cycle, des groupements fonctionnels et leur position. ....	57
Figure 5: Schéma montrant la biogenèse des eicosanoïdes .....	60
Figure 6: Schéma de la biogenèse de la prostaglandine H2 .....	61
Figure 7: Schéma de la biogenèse de leucotriènes à partir de l'acide arachidonique .....	63
Figure 8: Mécanisme de formation de quelques eicosanoïdes induite par la stimulation des récepteurs inflammatoires dans les macrophages [89]. ....	66
Figure 9: Voies de synthèse des eicosanoïdes sous stimulation par des endotoxines (vert) et/ ou des agonistes favorisant un afflux transitoire de calcium (en rouge) ou un afflux durable de calcium (en jaune). ....	67
Figure 10: Evolution de l'expansion de la lipidomique dans la recherche en général et dans les maladies cardiovasculaires tel que l'athérosclérose.....	70
Figure 11: Schéma récapitulatif des étapes d'une extraction en phase solide. ....	78
Figure 12: Réaction de greffage sur un silanol.....	90
Figure 13: Schémas d'un greffage par A) polymérisation verticale et par B) polymérisation horizontale [168].....	91
Figure 14: Chromatogramme type d'un soluté quelconque [193] .....	97
Figure 15: Pic gaussien avec les différentes méthodes d'intégration pour le calcul de l'efficacité [195].....	99
Figure 16: Représentation schématique des cinq différentes interactions soluté-phase stationnaire de l'équation 13 [207]. ....	105
Figure 17: Schéma du fonctionnement du détecteur Corona® CAD.....	118
Figure 18: Mécanisme d'ionisation par electron capture-APCI/MS [226]. ....	121
Figure 19: Diagramme schématique d'un ion moléculaire par électronebulisation [229].....	122
Figure 20: Représentation schématique d'un "filtre de masse" quadripôle ou séparateur d'ion ....	126



Figure 21: Représentation d'un quadripôle suivant Hoffmann et Stroobant [234].....	127
Figure 22: Schéma d'un triple quadripôle.....	128
Figure 23 : Schéma du principe de fonctionnement d'un analyseur TOF équipé d'un réflectron .....	130
Figure 24: Schéma du principe de fonctionnement d'un Q-TOF.....	131
Figure 25: Schéma d'un Orbitrap®.....	132
Figure 26: Représentation schématique du LTQ-Orbitrap® Velos Pro.....	135
Figure 27: Schéma de dérivatisation de la PGD2 par le 2-(2,3-naphtalimino)éthyl trifluoromethanesulfonate (NE-OTf) [254]. ....	139
Figure 28: Représentation des sélectivités prédites suivant le modèle de soustraction hydrophobe pour les sept phases stationnaires sous forme de radar plots.....	159
Figure 29: Evaluation de la rétention des sept phases stationnaires en mode isocratique.....	162
Figure 30 : Evaluation de l'efficacité apparente de sept phases stationnaires en mode isocratique. .....	163
Figure 31 : Evaluation de l'efficacité apparente intrinsèque de sept phases stationnaires en mode isocratique.....	164
Figure 32: Evaluation de la sélectivité des sept phases stationnaires en mode isocratique.....	165
Figure 33: Moyenne des facteurs de rétention pour quatre eicosanoïdes pour chacune des sept phases stationnaires évaluées en gradient linéaire.....	166
Figure 34: Moyenne des facteurs de rétention pour quatre eicosanoïdes sur les SEPT phases stationnaires en mode gradient optimisé. ....	167
Figure 35: Moyenne des hauteurs équivalentes à un plateau théorique (HEPT) pour sept phases stationnaires évaluées en mode gradient linéaire. ....	168
Figure 36: Moyenne des hauteurs équivalentes à un plateau théorique réduit (h) pour 7 phases stationnaires évaluées en mode gradient linéaire. ....	169
Figure 37 : Evaluation de la sélectivité des sept phases stationnaires pour la séparation des prostanoides en gradient linéaire. ....	171
Figure 38: Schéma illustrant le mécanisme de rétention des acides gras polyinsaturés, la résistance stérique à la pénétration et des interactions polaires secondaires sur une phase C18 et une phase C18 avec groupements polaires intégrés(GPI). ....	173
Figure 39: Capacité de pic par minute en fonction des phases stationnaires. ....	174
Figure 40: Evaluation du time needed pour la séparation d'un mélange complexe d'eicosanoïdes sur les sept phases stationnaires.....	175

Figure 41: Chromatogrammes obtenus pour des conditions optimales de séparations des eicosanoïdes pour les sept phases stationnaires.....	178
Figure 42: Evaluation du pH de la phase mobile sur la rétention des leucotriènes sur Accucore™ C30.....	180
Figure 43: Effet de la température sur la rétention des eicosanoïdes sur Accucore™ C30. ....	181
Figure 44: Evaluation de la sélectivité en fonction de l'augmentation de la température entre certains isomères d'eicosanoïdes sur Accucore C30.....	182
Figure 45: Effet du changement de la phase organique sur la séparation d'un mélange complexe d'eicosanoïdes. ....	184
Figure 46: Profilage de 24 oxylipines et 2 acides gras polyinsaturés par UHPLC à polarité de phases inversée sur Accucore™ C30. ....	186
Figure 47: Profils de séparation des eicosanoïdes en NP-HPLC sur Kinetex. ....	191
Figure 48: Comparaison de profil des eicosanoïdes sur Kinextes avec la meilleure phase mobile. ....	192
Figure 49: Séparation des eicosanoïdes sur Luna NH2 avec une phase mobile à base d'isooctane et acétate d'éthyle. ....	193
Figure 50: Optimisation de phases mobiles pour la séparation des eicosanoïdes sur Luna NH2 en gradient linéaire. ....	194
Figure 51: Comparaison de profilage d'eicosanoïdes et précurseurs en mode gradient linéaire et optimisé sur Luna NH2.....	195
Figure 52: Comparaison de profils de séparation d'eicosanoïdes et précurseurs sur Nucleosil. .	196
Figure 53: Optimisation des profils de séparation des eicosanoïdes sur Hypersil Gold™ CN...	198
Figure 54: Profilage de 24 eicosanoïdes et 2 acides gras polyinsaturés par HPLC à polarité de phases normale. ....	201
Figure 55: Acquisition en mode full scan de la TXB2 en ESI positif et négatif sur un LTQ-Orbitrap® Velos Pro.....	203
Figure 56: Optimisation de la tension de source HESI. ....	205
Figure 57: Optimisation de la fréquence d'acquisition sur la trappe ionique linéaire .....	208
Figure 58: Diagramme d'optimisation de l'énergie de fragmentation par CID (en haut) et par HCD (en bas) de la PGE2, la PGF2 $\alpha$ et la 15-HETE.....	210
Figure 59: Spectres de fragmentation par a) CID et par b) HCD du 11-HETE sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro. ....	212

Figure 60: Spectres MS <sup>2</sup> issus de la fragmentation par HCD sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro .....	213
Figure 61: Spectres MS <sup>2</sup> issus de la fragmentation par CID (a) et par HCD (b) de la PGI2 .....	214
Figure 62: Analyse d'eicosanoïdes par SRM et DDA. ....	217
Figure 63: Influence de la segmentation du profil chromatographique sur la détection de certains isobares et isomères sur un LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA segmenté. ....	219
Figure 64: Illustration des spectres de fragmentation de la PGE2 et la PGD2. ....	220
Figure 65: Optimisation du solvant pour l'étape de lavage de chaque cartouche.Kd .....	236
Figure 66: Optimisation du solvant pour l'élution de chaque cartouche SPE. ....	238
Figure 67: Comparaison des performances des 7 cartouches SPE testées avec leur protocole optimisé respectif. ....	242
Figure 68: Influence du pH sur le rendement d'extraction .....	245
Figure 69: Comparaison de l'extraction liquide liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE). ....	247
Figure 70 : Identification du 13-HODE relargué par les macrophages. ....	253
Figure 71: Profilage global des oxylipines et un précurseur d'eicosanoïde sécrétés par les macrophages J774 stimulés ou non par le LPS pendant 8h et 24h et analysés par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) .....	254
Figure 72: Profilage des oxylipines et un précurseur d'eicosanoïde sécrétés par les macrophages THP-1 stimulés ou non par le LPS pendant 8h et 24h et analysés par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro). ....	255
Figure 73: Profilage global des oxylipines et un précurseur d'eicosanoïde sécrétés par les macrophages THP-1 et J774 stimulés ou non par le LPS pendant 8h et 24h et analysés par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) .....	256
Figure 74: Profilage global des eicosanoïdes relargués par les macrophages THP-1 et J774 stimulés ou non par le LPS pendant 8h et 24h et analysés par RP-HPLC-QqQ (MRM) (LCMS-8060) .....	258
Figure 75: Représentation graphique sous forme de carte de chaleur des surfaces des transitions de médiateurs lipidiques détectés dans les surnageants des macrophages J774 et THP-1 par LCMS-8060 en mode SRM (méthode Shimadzu) .....	261
Figure 76: Analyse en composantes principales des données quantitatives des macrophages non surchargés en cholestérol dans différentes conditions de culture .....	266

Figure 77: Evaluation quantitative des oxylipines et AGPI produits par les macrophages J774 dans différentes conditions de traitements. ....	268
Figure 78: Analyse quantitative des oxylipines et AGPI produits par les macrophages THP-1 dans différentes conditions de traitements. ....	269

# Liste des tableaux

Tableau 1: Récapitulatif des fonctions des eicosanoïdes sur divers organes. [77].....	54
Tableau 2: Relation entre les précurseurs d'eicosanoïdes et la série des prostanoïdes produits....	57
Tableau 3: Relation entre les précurseurs d'eicosanoïdes et la série des leucotriènes produits.....	58
Tableau 4: Quelques méthodes d'extractions et d'analyse des eicosanoïdes .....	80
Tableau 5: Récapitulatif des différentes largeurs d'un pic gaussien pour le calcul de l'efficacité d'une colonne chromatographique .....	98
Tableau 6: Récapitulatif non exhaustif des méthodes publiées en chromatographie liquide à polarité de phases inversée pour l'analyse des eicosanoïdes .....	112
Tableau 7: Différents types d'analyseurs [232] .....	125
Tableau 8: Tableau résumant les noms des standards de l'étude, leur structure et quelques caractéristiques .....	145
Tableau 9: les caractéristiques des 7 phases stationnaires utilisées pour le développement en RP-HPLC .....	152
Tableau 10: Les valeurs de sélectivité prédite suivant le modèle de soustraction hydrophobe pour chaque phase stationnaire .....	152
Tableau 11: Paramètre $F_s$ calculé pour l'ensemble des sept colonnes testées deux à deux.....	157
Tableau 12: Tableau récapitulatif des phases stationnaires à polarité de phases normale testées. ....	189
Tableau 13: Résumé des phases stationnaires avec les interactions.....	199
Tableau 14: Transitions et énergies optimales de fragmentation par CID et HCD des eicosanoïdes sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro.....	215
Tableau 15: Résultats de validation : Limite de détection et linéarité.....	223
Tableau 16: Résultats de validation ( Exactitude intra et inter-jour).....	225
Tableau 17: Résultats de validation ( Précision intra et inter-jour).....	226
Tableau 18: Caractéristiques des cartouches de SPE de l'étude .....	234
Tableau 19: Récapitulatif cartouches SPE-protocole optimal associé. ....	239
Tableau 20: Rendements d'extraction d'eicosanoïdes et effet de matrice sur Strata™-X .....	244
Tableau 21: Inventaire du nombre de médiateurs lipidiques produits en fonction du type cellulaire et des conditions de stimulations .....	260

# Abréviations

AA : Arachidonic acid

ABC : ATP Binding Cassette

ACAT : Acylcholesterol transferase

aCEH : Acide cholesteryl ester hydrolase

ACP : Analyses en Composantes Principales

AG : Acides Gras

AGPI : Acide Gras Polyinsaturés

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

APCI : Atmospheric pressure chemical ionization

ATCC : American Tissue Culture Collection

ATP : Adénosine-Triphosphate

AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux

BHT : Butylatedhydroxyl toluene

CE : Cholestérol Ester

CES1 : Carboxylestérase 1

CID : Collision Induced Dissociation

CLA : Clarinet

CL : Cholestérol libre

CML : Cellules Musculaires Lisses

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

COX : Cyclooxygénase

CV : Coefficient de variation

CYP450 : Cytochrome P450

EC : Esters de cholestérol

ECAPCI : Electron capture-atmospheric pressure chemical ionization

EDTA : Ethylenediaminetetra-acetic acid

EMA : European Medicines Agency

EPA : Eicosapentaenoic acid

ESI : Electrospray Ionization

FAS : Fatty acids synthase

FFA : Free Fatty acids

Fs : Paramètre de sélectivité

FIA : Flow injection analysis

GC : Chromatographie gazeuse

GPI : Groupement Polaire Intégré

HCD : Higher Energy Collision Dissociation

HDHA : Hydroxydocosahexaenoic acid

HDL : High Density Lipoprotein

HEPE : Hydroxy- eicosapentaenoic acid

HEPES :4-(2-hydroxyethyl) piperazineethanesulfonic acid

HESI-II : Heated Electrospray Ionisation

HETE : Hydroxy-eicosatetraenoic acid

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid )

HLB : Hydrophilic–Lipophilic Balance

HMDM : Human Monocyte-Derived Macrophages

HMG-CoA :  $\beta$ -Hydroxy  $\beta$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)

HODE : Hydroxy-octadecadienoic acid

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry

HSM : Hydrophobic Substraction Model

iNOS : Nitric Oxide Synthase

LC : Chromatographie liquide

LDL : Low Density Lipoprotein

LDL-C : LDL Circulant

LFER : Linear Free Energy Relationships

LLE : Liquide-Liquide Extraction

LOX : Lipoxygénase

LTB4 : Leucotriène B4

LTD4 : Leucotriène D4

LTE4: Leucotriène E4

LXR : liver X receptor

MCC : Milieu de Culture Complet

MCI : Milieu de Culture Incomplet

ME : Effet de matrice

MeOH: Méthanol

MLCK : Myosin light chain kinase

MPO : Myéloperoxydase

MRM : Multiple Reaction Monitoring

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate



nCEH : neutral cholesteryl ester hydrolase

NE-OTf : 2-(2,3-naphthalimino)ethyl trifluoromethanesulfonate

NP-HPLC : Chromatographie liquide haute performance à polarité de phases normale.

OS : oxystérols

PA : Acide Phosphatidique

PC : Phosphatidyl-choline

PE : Phosphatidyl-éthanolamine

PI : Phosphatidyl-inositol

PG : Prostaglandine

PGE2 : Prostaglandine E2

PGE3 : Prostaglandine E3

PGF1 $\alpha$  : Prostaglandine F1 $\alpha$

PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F2 $\alpha$

PKA : Protéine Kinase A.

PLS : Partial Least Squares Discriminant Analysis

PL : Phospholipides

PPARs  $\alpha/\gamma$  : Peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  et  $\gamma$

PS : Penicilline-Streptomycine

PS : phosphatidyl-sérine

P2X : Purinoreceptor

P2Y : Purinergic G protein-coupled receptors

QSRR: Quantitative Structure–Retention Relationships

QTOF : Quadrupole Time-Of-Flight

R: Rendement reel d'extraction

RA: Rendement apparent

RP-HPLC : Chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée.

Sans-GPI : Sans Groupement Polaire Intégré

SLE : Supported Liquid Extraction

SM: Spectrométrie de masse

SOAT : Sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase)

SPE: Extraction en phase solide

SREBP : Sterol regulatory element-binding protein

SRM: Selected Reaction Monitoring

SR-BI : Scavenger receptor class B type 1

SVF : Serum de Veau Fœtal

TIC : Total Ion Chromatogram

TLR4 : Toll-Like Receptor

TX: Thromboxane

TXB1 : Thromboxane B1

TXB2 : Thromboxane B2

UHPLC : Chromatographie Liquide Ultra Haute performance

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

# Préambule

L'athérosclérose est une pathologie due au dépôt de plaque d'athérome dans l'intima des artères. Il en résulte à moyen et long terme une hypertension artérielle, des maladies cardio-vasculaires à savoir des crises cardiaques, des accidents vasculaires cérébraux, etc. L'athérosclérose représente la principale cause de mortalité dans le monde. Il s'agit de la deuxième cause de mortalité en France après le cancer, occasionnant de lourdes dépenses pour le système de santé. Malgré les nombreuses avancées dans la compréhension de cette pathologie, nous sommes encore loin de vaincre cette maladie. Par abus de langage, il est courant d'entendre dire que « l'athérosclérose est due au dépôt de cholestérol dans les cellules ». En réalité, le cholestérol ne s'accumule pas directement dans les artères mais ce sont des cellules immunitaires gorgées de cholestérol qui forment la plaque d'athérome. De l'accumulation du cholestérol dans les cellules jusqu'à la rupture d'une plaque d'athérosclérose, plusieurs acteurs sont impliqués, dont les macrophages qui feront l'objet de notre étude. En effet, il s'agit de cellules jouant un rôle d'intermédiaire entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. De nombreux travaux basés sur des modèles de macrophages ont permis à ce jour de lever des zones d'ombres sur cette maladie notamment en ce qui concerne les facteurs nucléaires et moléculaires impliqués dans la cascade de signalisation cellulaire. Parmi les facteurs moléculaires, il semble que les eicosanoïdes impactent la phosphorylation de la protéine d'efflux ABCA1, et ce faisant altèrent son fonctionnement normal. Les eicosanoïdes sont des molécules lipidiques structurellement proches, impliquées dans plusieurs maladies inflammatoires. Le caractère redondant ou d'opposition en termes de rôle de ces molécules lors du développement de processus inflammatoire, complique l'exploration des mécanismes moléculaires impliqués en étudiant un nombre limité d'espèces d'eicosanoïdes. La complexité et la ressemblance structurale des eicosanoïdes implique des stratégies particulières pour les analyser. Nombreuses méthodes en techniques séparatives permettent d'analyser de manière simultanée l'ensemble du lipidome en eicosanoïdes de différentes matrices mais se trouvent limitées en termes de quantification d'isobares co-élués et/ ou d'espèces minoritaires. L'évaluation quantitative des eicosanoïdes est complexe en raison de leur diversité biologique et de leur similarité structurale. Le mode d'acquisition MRM couramment utilisé pour la quantification des eicosanoïdes n'est pas suffisant lorsque des isobares partageant les mêmes fragments spécifiques ne sont pas séparés en amont du spectromètre de masse. A cela, il faut ajouter que les eicosanoïdes sont présents à l'état de traces dans les matrices biologiques, se dégradent et s'oxydent très facilement en d'autres dérivés lors de la préparation d'échantillons.

Les objectifs généraux de cette thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay sont de proposer une approche analytique permettant de :

- résoudre les difficultés en termes de sélectivité de séparation des nombreux isobares et isomères d'eicosanoïdes par la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse
- de tenter de relier la variation d'efflux de cholestérol des macrophages (étudié par les membres de l'équipe de biologie de l'unité interdisciplinaire Lip(Sys)<sup>2</sup>) à la variation quantitative d'eicosanoïdes.

Pour mener à bien ce projet, notre stratégie s'articule en 3 grandes parties

- Après un état de l'art sur l'analyse des eicosanoïdes et leur implication dans les processus inflammatoires, nous avons établi l'inventaire des méthodes analytiques utilisées à ce jour pour le prétraitement d'échantillons contenant des eicosanoïdes, leur extraction et leur analyse par différentes techniques séparatives et leur détection.

- Notre deuxième partie dévolue aux travaux expérimentaux, se subdivise en 5 chapitres :

- Un premier chapitre est consacré à l'optimisation de la séparation chromatographique en RP-HPLC couplé au détecteur d'aérosol chargé (Corona CAD®) dans le but de résoudre les problématiques liées à la séparation d'isobares et d'isomères d'eicosanoïdes au travers d'un choix de phase stationnaire adaptée. Sur la base du modèle de soustraction hydrophobe de Snyder, 7 phases stationnaires de sélectivité différente ont été sélectionnées. Il s'en est suivi une optimisation de la séparation à partir de 26 standards (24 eicosanoïdes et 2 acides gras polyinsaturés) sur chaque phase stationnaire différant de par leur chimie de greffage, la nature de la silice ainsi que la longueur de la chaîne greffée.
- Le deuxième chapitre nous a permis d'explorer les performances de 4 phases stationnaires à polarité de phases normale pour la séparation des eicosanoïdes et d'évaluer la complémentarité entre la NP-HPLC et la RP-HPLC pour la séparation de certaines espèces de ces médiateurs lipidiques.
- Le troisième volet de la partie II a consisté à développer une méthode de quantification des eicosanoïdes par RP-UHPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) en mode DDA comme alternative à une analyse par le mode MRM disponible sur un spectromètre de masse de type triple quadripôle.

- Il s'en est suivi l'optimisation de la préparation d'échantillons (Chapitre 4). Nous avons de ce fait réalisé un screening de 7 cartouches SPE différant de par la nature du matériel, leur chimie, la taille des particules ainsi que la quantité de phase. Cette optimisation a permis de sélectionner la cartouche qui a permis de réaliser l'extraction des eicosanoïdes sécrétés par des macrophages J774 et monocytes THP-1 (différenciés en macrophages) dans différentes conditions de culture et de stimulation pour mimer le développement de l'athérosclérose.
- Le dernier chapitre de cette partie illustre l'application des méthodes développées sur des échantillons cellulaires. Ainsi, une étude comparative de deux modèles cellulaires J774 et THP-1 a été réalisée et a permis de mettre en lumière un profilage en eicosanoïdes dépendant du type cellulaire. Il s'en est suivi d'une analyse quantitative en eicosanoïdes relargués par les deux modèles de macrophages aboutissant à relier l'efflux du cholestérol constaté à la variation de certains eicosanoïdes.

- La troisième partie a été consacrée à la discussion de nos résultats et à une conclusion générale suivie des perspectives.

**Partie I: De la compréhension du  
développement de l'athérosclérose à  
l'analyse de médiateurs lipidiques**

# **Chapitre 1: L'athérosclérose**

# **I. Définition**

Selon un rapport de 1958 de l’OMS, l’athérosclérose a été définie comme une association variable de remaniements de l’intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s’accompagnant de modifications de la média [1]. Son développement est en général silencieux, restant longtemps asymptomatique et ce n’est que la rupture de la plaque d’athérosclérose qui se traduit par un accident vasculaire aigu et les complications qui s’y rattachent.

## **II. Genèse de la plaque d’athérome**

La physiopathologie de l’athérosclérose est aujourd’hui bien décrite dans la littérature [2–4]. La caractérisation des stades évolutifs histologiques de l’athérosclérose est importante pour comprendre les mécanismes qui interviennent dans la formation des plaques.

### **1. La formation des cellules spumeuses**

La membrane d’une artère est composée de trois couches : l’intima (comprenant l’endothélium et l’espace sous-endothélial), la média et l’adventice. La première étape de l’athérosclérose est l’accumulation des lipoprotéines de basse densité (LDL) dans l’intima. Ce phénomène est influencé par la concentration du LDL-Cholestérol plasmatique. Ces lipoprotéines athérogènes passent dans l’espace sous-endothélial par transcytose où elles sont retenues et subissent une modification oxydative par différents mécanismes notamment enzymatiques [2]. L’oxydation des LDL est une étape essentielle de conversion des particules lipidiques en particules athérogènes. Les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses peuvent promouvoir l’oxydation des LDL. Les mécanismes expliquant l’oxydation des LDL mettent en jeu la production d’espèces radicalaires de l’oxygène et certaines enzymes qui contribuent fortement à l’oxydation des lipoprotéines, telles que des lipoxygénases (LOs), myéloperoxydase (MPO), nitric oxide synthase (iNOS) et NADPH oxydases [4,5]. Il existe des preuves solides de l’implication du 12/15-LO dans la formation de LDL oxydées (oxLDL) et dans le développement de l’athérosclérose dans des modèles animaux. Cette dernière conclusion a été faite sur la base d’expériences évaluant les effets du gain et de la perte d’activité de 12/15 LO chez des Souris



sujettes à l'athérosclérose [5]. Paradoxalement, la surexpression de 15-LO chez le lapin réduit l'athérosclérose. Les inhibiteurs d'oxydation des LDL sont donc une piste thérapeutique [6].

Les oxLDL sont à l'origine d'une activation des cellules endothéliales qui produisent des facteurs chimiotactiques et des molécules d'adhésion à leur surface aboutissant au recrutement des monocytes et lymphocytes T circulants. Ces derniers migrent dans l'espace sous-endothélial [5]. Les monocytes se différencient ensuite en macrophages qui expriment des récepteurs épurateurs « scavenger ». Ces récepteurs permettent l'internalisation des lipoprotéines oxydées [4]. L'expression de ces récepteurs, contrairement aux récepteurs au LDL natives, n'est pas régulée par le contenu intracellulaire en cholestérol. Ainsi, les macrophages captent les oxLDL en forte quantité ce qui aboutit à la formation de cellules gorgées de cholestérol appelées cellules spumeuses.

## **2. Les stries lipidiques**

Elles sont caractérisées par un plus grand nombre de cellules spumeuses. Les stries lipidiques sont d'origine essentiellement macrophagique mais proviennent aussi de quelques cellules musculaires lisses gorgées de lipides formant de petits amas visibles à l'œil nu. Il s'agit d'un stade réversible.

## **3. Formation de la plaque mature**

L'évolution se poursuit par l'accumulation de dépôts lipidiques extracellulaires dûs à la mort des cellules spumeuses et formant des agrégats. Le regroupement des lipides extracellulaires et intracellulaires constitue le cœur lipidique de la plaque (athérome ou plaque simple). Ce cœur lipidique est ensuite isolé de la lumière artérielle par la formation d'une chape fibreuse constituée de mucopolysaccharides, d'élastine, de fibrine, de collagènes et de cellules musculaires lisses (CML) [2]. La formation de ce tissu fibreux est exclusivement assurée par les CML migrant de la media vers l'intima. Le cœur lipidique (athérome) entouré de la chape fibreuse (sclérose) représente le stade de la plaque d'athérosclérose défini par l'OMS. Cette chape fibreuse est un facteur de stabilité de la plaque d'athérome.

À terme, le danger des plaques d'athérosclérose réside dans les éventuelles complications (hémorragies intra-plaques, ulcération, rupture...) qui augmentent le volume de la plaque et/ ou sont responsables des accidents aigus potentiellement dramatiques. La recherche est extrêmement orientée vers la compréhension des mécanismes conduisant à la fragilisation d'une plaque et à sa rupture. Dans ce projet, nous nous intéressons au stade précoce de la formation des cellules spumeuses pour comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de ces cellules. Pour

cela, nous allons aborder brièvement dans le paragraphe qui suit, le trafic du cholestérol et les anomalies possibles décrites quant à la réduction de sa sortie.

#### **4. Les diverses voies de transport plasmatiques du cholestérol**

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme du cholestérol. Dans sa revue sur le métabolisme des HDL (High Density Lipoprotein), Gautier, *et al.* [7] distinguent trois principales voies du métabolisme des lipoprotéines en mettant le foie au centre des trafics :

- la voie entéro-hépatique : transport des lipides exogènes de l'intestin vers le foie,
- la voie d'apport qui assure le transport centrifuge des lipides du foie vers les tissus périphériques. Comme évoqué plus haut, cette voie permet d'alimenter les cellules en cholestérol pour leurs différents processus métaboliques.
- la voie du transport inverse du cholestérol , permettant un transport centripète du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Cette voie permet le maintien de l'homéostasie puisque le cholestérol en excès des tissus extra-hépatiques est ramené au foie, seul organe capable de l'éliminer. Notre problématique de thèse tourne autour de cette dernière voie d'efflux

### **III. L'efflux du cholestérol**

#### **1. Régulation du cholestérol cellulaire**

Le cholestérol est un élément constitutif essentiel des membranes cellulaires. Outre son rôle dans la construction des cellules, le cholestérol est nécessaire pour la production d'hormones, de vitamine D et des acides biliaires. Le mode de vie d'un individu ainsi que des facteurs génétiques peuvent conduire à une production et une accumulation de cholestérol dans les artères aboutissant aux maladies cardio-vasculaires.

Les réactions de synthèse, d'absorption et d'élimination du cholestérol cellulaire sont régulées de manière complexe par deux systèmes de récepteurs nucléaires principaux: les protéines de liaison aux éléments régulateurs du stérol (SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein) et les récepteurs X du foie (LXR : liver X receptor) [8].

L'activation des SREBP augmente la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des lipides dont le cholestérol cellulaire. En revanche, l'activation de LXR permet notamment l'expression

des gènes codant des protéines impliquées dans la sortie ou efflux du cholestérol qui est la première étape du transport inverse du cholestérol. Les SREBP dont il existe trois isoformes (SREBP 1a, 1c et 2) sont de véritables senseurs situés dans le réticulum endoplasmique (RE) et activés par une cascade protéolytique en cas de diminution du cholestérol intracellulaire [9]. Ceci permet d'obtenir la partie active NH<sub>2</sub>-terminale des SREBP qui entre dans le noyau pour activer l'expression des gènes ayant une séquence SRE dans leur promoteur. Ces gènes sont notamment ceux codant une enzyme clé de la synthèse endogène de cholestérol (HMG-CoA réductase) et le récepteur LDL (LDL-R) qui permet aux cellules de capter le cholestérol porté par les LDL circulantes [5]. A l'inverse, quand la concentration de cholestérol cellulaire augmente au-delà d'un certain seuil, ces activations via les SREBP cessent.

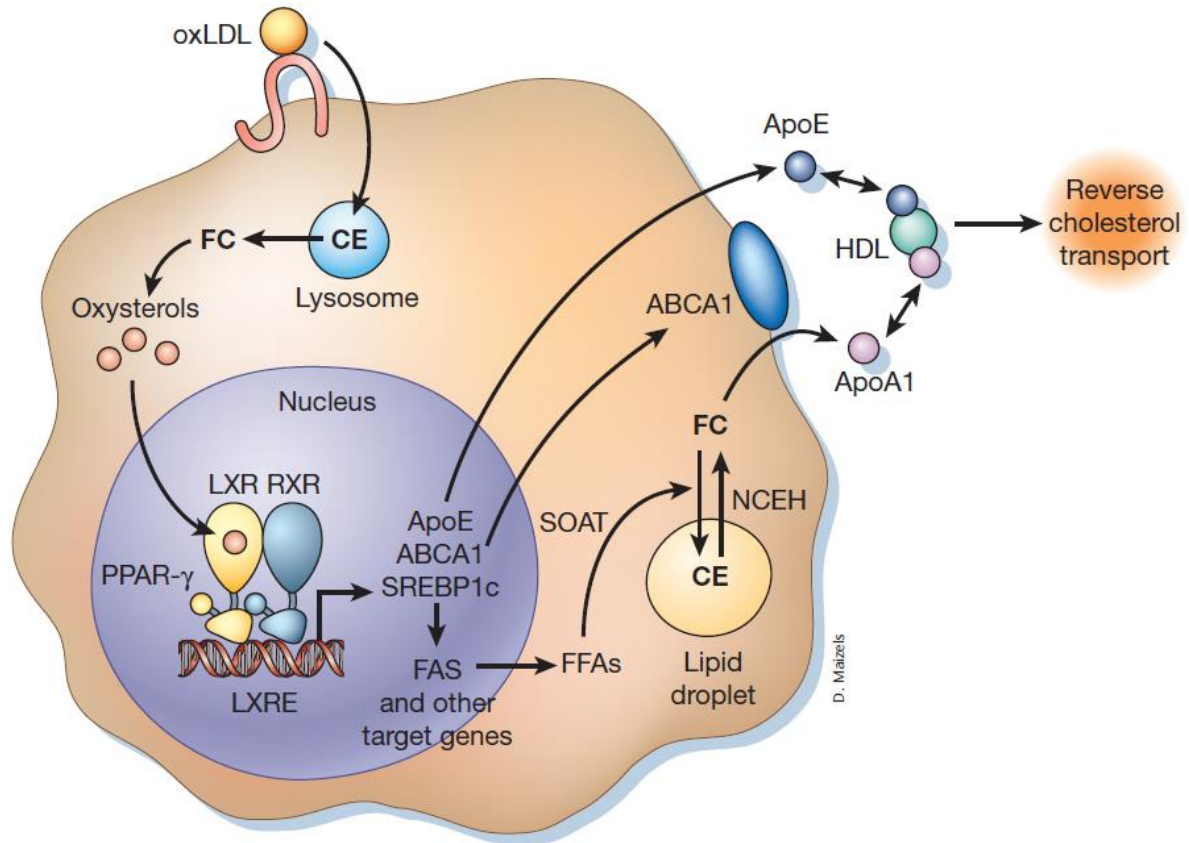
Il existe une autre voie de régulation de l'homéostasie du cholestérol médiée par les récepteurs LXR- $\alpha$  et LXR- $\beta$ . LXR- $\alpha$  et LXR- $\beta$  appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription qui agissent sur leurs gènes cibles quand ils sont activés par des petits ligands hydrophobes tels que les oxystérols (OS) (**Fig.1**). Le LXR- $\beta$  a un profil d'expression ubiquitaire tandis que le LXR- $\alpha$  présente un haut niveau d'expression dans les tissus ayant un métabolisme lipidique élevé comme le foie, l'intestin et les macrophages surchargés en cholestérol. Une fois activés par les OS, les LXR doivent former des hétérodimères avec les récepteurs X du rétinoïde (RXR) pour se lier à des éléments de réponse spécifiques dans les promoteurs ou les amplificateurs des gènes cibles [8]. Ainsi, les LXR déclenchent l'activation de nombreux gènes cibles [5] dont ceux codant pour des protéines permettant l'efflux du cholestérol à l'instar de ABCA1. Ce rôle régulateur est primordial pour les cellules des tissus périphériques qui ont un excès de cholestérol puisqu'elles sont incapables de le dégrader. Il est donc indispensable qu'elles puissent le céder à des accepteurs extracellulaires qui le rapporteront au foie, seul organe capable de l'éliminer tel quel ou sous forme d'acides biliaires.

Les LXR induisent l'expression de transporteurs, les ABC (ATP Binding Cassette) A1 et G1 qui cèdent le cholestérol libre (CL) en excès à des accepteurs extracellulaires qui sont les HDL matures pour l'ABCG1 et les pré $\beta$ -HDL (apoA ou apoE faiblement lipidées) pour l'ABCA1. On sait que ce dernier joue un rôle fondamental chez l'Homme comme en témoignent les patients porteurs de mutations du gène de ce transporteur, qui sont responsables de la maladie de Tangier avec apparition d'une athérosclérose précoce [5,10,11].. Des expériences de transplantations de moelle osseuse déficiente en ABCA1 ont montrées des Souris avec des lésions d'athéroscléroses plus poussées par rapport aux Souris sauvages [12,13]. L'importance de ce transporteur ABCA1 dans

l'efflux du cholestérol est renforcé par de nombreuses études associant un grand nombre de polymorphisme d'ABCA1 à des maladies coronariennes dans la littérature [14].

Les LXR induisent aussi l'expression de l'ApoE dans les macrophages qui la libèrent dans le milieu extracellulaire afin qu'elle serve d'accepteur du cholestérol transporté par l'ABCA1.

Enfin, le LXR- $\alpha$  induit la synthèse d'acides gras (AG) qui sont les substrats préférentiels de l'acyl coenzyme A: acylcholesterol transferase (ACAT ou connu également sous le nom de SOAT) dans les réactions d'estérification du cholestérol. Une cellule ne conserve jamais dans son cytoplasme le cholestérol sous forme libre en raison de sa toxicité. Elle l'estérifie grâce à l'action de l'ACAT ce qui permet de former des gouttelettes lipidiques (lipid droplets) d'esters de cholestérol dénuées de toxicité. Ainsi, ABCA1 et SOAT agissent de concert pour réduire les niveaux de cholestérol libre et protéger les cellules de ses effets cytotoxiques (**Fig.1**). Le cholestérol peut être présent dans les macrophages sous forme estérifiée et libre, mais seul le cholestérol libre (CL) peut subir l'efflux [9]. Dans les macrophages spumeux, le cholestérol est majoritairement présent sous forme estérifié, soit par estérification du CL par l'acyl Coenzyme A cholesterol acyl transferase (ACAT), soit provenant directement des LDL oxydées riches en ester de cholestérol. L'hydrolyse des esters de cholestérol (EC) en CL est catalysée d'une part à pH acide par l'acide cholesteryl ester hydrolase (aCEH) dans les lysosomes lors du phénomène d'endocytose des LDL oxydées (**Fig.1**), et d'autre part à pH neutre par la neutral cholesteryl ester hydrolase (nCEH) connue sous le nom de carboxylestérase 1 (CES1) qui hydrolyse les EC stockés dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques.



**Figure 1: Schéma montrant les mécanismes de régulation du cholestérol dans une cellule [5].**

Les LDL oxydées sont endocytées et dégradées dans le lysosome libérant leur cholestérol dont une partie subit des réactions d'oxydation et d'hydroxylation donnant naissance à des oxystérols. Certains de ces oxystérols générés, activent LXR–RXR qui entraînent une augmentation de la transcription des gènes cibles codant l'ApoE et l'ABCA1. Ces derniers participent à l'efflux du cholestérol cellulaire en le donnant à des accepteurs extracellulaires qui le rapportent au foie : c'est le transport inverse du cholestérol. La Fatty acids synthase (FAS) conduit à la synthèse d'acides gras libres (Free Fatty acids : FFA) utilisés pour l'estérification du cholestérol par l'acyl coenzyme A: acylcholesterol transferase (ACAT ou SOAT). Les PPAR, comme le PPAR $\gamma$  peuvent stimuler l'efflux du cholestérol en induisant l'expression de LXR- $\alpha$ . CE : cholestérol ester.

## 2. Les voies d'efflux du cholestérol

Les cellules des tissus périphériques ne disposent pas de voies du catabolisme de cholestérol. Elles dépendent du transport inverse du cholestérol dont la première étape qui est l'efflux du cholestérol, est explorée dans le cadre de notre travail de thèse. Il s'agit d'une voie métabolique majeure anti-athérogène conduisant à la réduction de cholestérol des cellules, et donc empêchant indirectement la formation de cellules spumeuses. En effet, les cellules spumeuses pour se débarrasser du cholestérol en excès, le cèdent à un accepteur extracellulaire tels que les HDL et /ou à des pré $\beta$ -HDL [7] : c'est la première étape du transport inverse du cholestérol vers le foie et est considéré comme une étape fondamentale dans la cardioprotection [15,16]. A ce jour, il existe trois voies connues assurant l'efflux du cholestérol en excès des cellules [16–18]. Il s'agit :

- du processus de diffusion aqueuse non spécifique
- du transport du cholestérol via le récepteur scavenger classe B type I (SR-BI) de la Souris ou CD36 ou CLA-1 chez l'Homme
- des transporteurs ABC: ABCA1 et ABCG1

## **2.1. La diffusion aqueuse non spécifique**

Le phénomène d'efflux du cholestérol libre des cellules a été démontré pour la première fois lorsqu'on a découvert que le cholestérol radiomarqué fait un échange bidirectionnel par transport passif entre le cytoplasme d'un globule rouge et le plasma [17,19,20]. Les molécules de cholestérol suivant cette voie sortent par diffusion passive en s'adsorbant sur des HDL. Au vu de la structure du cholestérol libre, le processus de sortie commence par une désorption du cholestérol à partir d'un donneur à l'interface lipide-eau suivie d'une diffusion au travers de la phase aqueuse jusqu'à ce que ces molécules de cholestérol rencontrent et s'adsorbent sur un accepteur tel que les HDL. Plusieurs études de cinétique d'échange ont été réalisées pour comprendre le mécanisme de sortie du cholestérol libre des cellules [21,22]. Une étude d'évaluation du flux bidirectionnel de CL [23], a démontré que l'appauvrissement en phospholipides des HDL réduit leur capacité à accepter le cholestérol libre cellulaire. Aussi, il semble clair que la sortie du cholestérol n'est pas dépendante de la concentration de la molécule acceptrice mais de sa composition [19]. En fait, le cholestérol libre passe par un processus de désorption d'un donneur suivant une cinétique lente et son adsorption sur la particule HDL avec une cinétique beaucoup plus rapide [17,19]. Ce processus d'efflux est dit non spécifique car la nature de l'accepteur est en fait hétérogène : HDL mais aussi LDL ou encore *in vitro* des vésicules de PL ou de l'albumine. En conclusion, la diffusion aqueuse est un mécanisme passif d'efflux du cholestérol relativement peu efficace mais qui a l'avantage d'exister dans toutes les cellules. Sa contribution au processus global d'efflux est variable d'un type cellulaire à l'autre selon qu'il existe ou non des mécanismes supplémentaires médiant la sortie du CL membranaire.

## **2.2. L'efflux de cholestérol libre médié par le récepteur SR-BI**

D'abord identifié comme un récepteur épurateur « scavenger » grâce à sa capacité de fixation des LDL acétylées [24], le récepteur SR-BI (Scavenger receptor class B, type I), membre de la superfamille de récepteur CD36 est surexprimé dans le foie [19] où il intervient dans le transport inverse du cholestérol à double titre. En effet, le SR-BI participe à l'efflux du cholestérol en favorisant l'ancrage des HDL à la membrane plasmique ou en stimulant la désorption du

cholestérol membranaire présent en fortes quantités au niveau des cavéoles où se localise préférentiellement le SR-BI. Contrairement à l'ABCA1 qui s'adresse aux pré $\beta$ -HDL faiblement lipidées, le récepteur SR-BI interagit surtout avec des HDL matures [7]. Le cholestérol transporté par les HDL retourne au foie en étant capté de manière sélective par le récepteur SR-BI au niveau du foie en vue de son élimination. Des Souris déficientes en SR-BI et ApoE montrent des caractéristiques sévères d'athérosclérose avec une évidence de rupture de la plaque d'athérosclérose [25]. Toutefois, la pertinence physiologique de l'efflux médié par le SR-BI chez l'homme n'est pas établie [7].

### **2.3. Les transporteurs ABC**

Les transporteurs de la famille ABC sont des régulateurs clés de l'efflux du cholestérol des cellules et particulièrement des macrophages spumeux. Les transporteurs ABC principalement impliqués dans l'efflux du cholestérol sont ABCG1 et ABCA1 qui consomment de l'ATP pour assurer le transport de CL et de PL vers l'accepteur. Fort de ses deux domaines de liaisons à l'ATP et deux domaines transmembranaires à six hélices, l'ABCA1 est une protéine présente dans la membrane des cellules [26]. L'ABCA1 présente une forte affinité pour les pré $\beta$ -HDL et lie l'apoA1 faiblement lipidée. L'ABCA1 utilise alors l'ATP comme source d'énergie pour réaliser la translocation de PL et de CL au travers de la membrane plasmique vers la pré $\beta$ -HDL. Celle-ci, par le gain de cholestérol et de PL se transforme en HDL matures qui seront acceptrices à nouveau de CL cellulaire par l'intermédiaire de l'ABCG1. Il existe ainsi un effet synergique de l'ABCA1 et de l'ABCG1 dans l'efflux du cholestérol [27] et de phospholipides (PL) respectivement vers l'apoA-1 non lipidée grâce à l'ABCA1 puis les HDL matures via l'ABCG1. Il a été montré que des macrophages déficients en ces transporteurs présentent une diminution de l'efflux du cholestérol associé à un développement accéléré de l'athérosclérose [8]. Nous nous intéresserons plus particulièrement au transporteur ABCA1 dans notre travail de thèse du fait de son implication démontrée comme biomarqueur possible dont le contrôle pourrait réduire le risque de formation de cellules spumeuses [4,5]. En effet, l'efflux ABCA1-dépendant est la voie d'efflux la plus importante chez l'Homme. L'importance de ce transporteur est démontrée par l'existence de la maladie de Tangier due à une mutation rare de l'ABCA1 [28–30]. Plus de 20 mutations différentes ont été trouvées comme cause de la maladie de Tangier [8]. Il s'agit d'une maladie autosomale récessive qui se manifeste par une faible concentration circulante de HDL et d'apo A1, de LDL-C et une hypertriglycémie. Les patients souffrant de cette pathologie ont des amygdales oranges et des xanthes cutanés en raison de l'accumulation excessive de cholestérol dans les

macrophages et des complications précoces d'athérosclérose. Des études d'inactivation génétique suggèrent qu'ABCA1 et ABCG1 représentent ensemble environ 60 à 70% de l'efflux net de cholestérol vers les HDL [31]. Outre le fait que le risque d'athérosclérose est plus élevé chez les patients présentant des anomalies du gène ABCA1 [32,33], de nombreux modèles de Souris génétiquement modifiées montrent le rôle-clé de cette protéine dans l'efflux du cholestérol et son rôle protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose [12]. Enfin, comme toute protéine insérée dans la membrane plasmique, son activité est influencée par les variations physico-chimiques de la membrane, notamment la composition en AG des PL membranaires [16,34]. C'est pourquoi, en complément de ces travaux, nous nous sommes intéressés dans cette thèse, plus particulièrement à l'étude de l'impact de certains facteurs moléculaires tels que les eicosanoïdes issus des AG des PL membranaires sur la capacité des macrophages à céder leur cholestérol à un accepteur extracellulaire via l'ABCA1 [11,35].

#### **IV. Problématique biologique de l'étude**

Les rapports de l'OMS précisent que l'athérosclérose représente la première cause de décès au monde avec 30% de la mortalité [36]. C'est la deuxième cause de mortalité en France après le cancer, soit 150 000 morts par an. C'est la principale cause d'infarctus du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux (AVC), d'angine de poitrine et d'autres pathologies cardiovasculaires pouvant entraîner de lourds handicaps voire le décès. Les maladies cardiovasculaires restent la première cause de décès chez les femmes. En France, on dénombre environ 100 000 infarctus du myocarde et 80000 AVC [37]. Il s'agit donc d'un grave problème de santé publique au niveau mondial.

Plusieurs thématiques de recherche sur l'athérosclérose font l'objet d'investigation au travers de projets pluridisciplinaires [38–40]. Il faut souligner que le facteur biologique identifié comme le plus important à ce jour, comme accélérateur la genèse de l'athérosclérose est la concentration élevée du LDL-C (mauvais cholestérol). Plusieurs cellules de l'organisme notamment les macrophages sont impliquées dans le trafic du cholestérol vers le foie, qui est le seul organe capable de le dégrader [8,9]. Le rôle athéroprotecteur des HDL [4,41] via le transport du cholestérol excédentaire des cellules périphériques spumeuses vers le foie [4,41] est largement décrit dans la littérature. Le transfert du cholestérol des cellules spumeuses vers l'apo A1 liant le transporteur ABCA1-ATP dépendant pour donner des HDL est la première étape dans le mécanisme de



réduction de la formation de la plaque d'athérome [7,11]. La littérature rapporte que des patients ayant une protéine ABCA1 mutée présentent des sérums ayant une faible capacité à assurer l'efflux de cholestérol, une diminution des HDL et une épaisseur de l'intima-média plus importante [32]. Une corrélation significative entre l'efflux du cholestérol et l'expression de la protéine ABCA1 a été montrée [42]. Plusieurs facteurs moléculaires tels que les facteurs transcriptionnels impliqués dans des cascades de signalisation cellulaire interviennent dans la régulation de l'efflux du cholestérol. En effet, il a été montré dans la littérature que l'incorporation d'acides gras dans la membrane de macrophages influence la fluidité [43], l'organisation et la fonction des protéines transmembranaires [44]. Si certains facteurs telle que l'incorporation d'EPA ont été démontrés comme bénéfique à l'efflux du cholestérol [11], d'autres acides gras en revanche font l'effet contraire [45]. Ce faisant, l'équipe de biologie de l'unité interdisciplinaire Lip(Sys)<sup>2</sup> a décidé d'initier un thème de recherche sur l'étude de l'impact de la composition en acides gras (AG) des phospholipides (PL) membranaires sur l'efflux du cholestérol cellulaire en émettant l'hypothèse qu'une modification de cette composition influencerait l'activité des transporteurs du cholestérol en modifiant les propriétés physicochimiques des PL affectant ainsi l'organisation des membranes et/ ou en modifiant leurs rôles fonctionnels comme sources d'AG servant de seconds messagers dans les voies de signalisation lipidique. Ce type d'étude de recherche fondamentale trouve sa justification dans le contexte des maladies cardio-vasculaires où la composition en AG circulants varie pour des raisons nutritionnelles (par exemple un déséquilibre entre les apports en AGPI (Acides gras polyinsaturés)  $\omega$ -6 et  $\omega$ -3, ou encore un apport excessif en AG saturés) ou des raisons physiopathologiques, une anomalie typique rencontrée chez des patients à risque cardio-vasculaire tels que les sujets hypertriglycéridémiques, les patients obèses ou les diabétiques de type 2, étant une augmentation des concentrations circulantes des AG libres. Par ailleurs, en dehors même de tout contexte pathologique, la période postprandiale s'accompagne aussi d'un afflux d'AG dans l'environnement des monocytes-macrophages, AG libérés lors de l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides.

Afin de comprendre les mécanismes fondamentaux qui sous-tendent l'efflux du cholestérol ABCA1 dépendant, Hu *et al.* [11] ont montré que l'incorporation d'EPA dans la membrane de macrophage THP-1 surchargés en cholestérol induit une réduction de la phosphorylation des résidus sérine de l'ABCA1, se soldant par une dégradation du transporteur. Les auteurs pensent donc que la réduction de l'efflux serait liée à une inhibition de la voie de la protéine kinase A (PKA) et une diminution du niveau d'AMPc. A partir d'une évaluation de l'expression de

l'ABCA1 suite à l'incorporation d'AGPI, l'effet direct de l'EPA sur l'expression de ABCA1 a été écarté [11]. L'équipe de biologie de l'unité interdisciplinaire Lip(Sys)<sup>2</sup> a récemment montré [45] que l'incorporation d'acide trans élaïdique et palmitique dans la membrane de macrophages J774 réduit significativement l'efflux de cholestérol ABCA1-dépendant respectivement de 36% et 22 %. En revanche, l'incorporation d'acides gras de la série trans dans la membrane des macrophages J774 n'a aucun impact sur l'efflux du cholestérol médié par SR-BI ( Scavenger receptor class B type 1) et ABCG1 (ATP Binding Cassette de classe G1) [45]. Les mécanismes précis par lesquels les acides gras trans modifient la fonction de l'ABCA1 ne sont pas très bien connus ou totalement explorés. Des travaux relativement récents [45–47] ont permis de préciser que la diminution de la fluidité membranaire par incorporation d'acides gras trans altère la liaison de l'apolipoprotéine AI (Apo AI) à l'ABCA1 et/ ou l'activité ATPase de l'ABCA1, les deux processus étant nécessaires à l'activité efficiente de la protéine ABCA1. Les expériences de suppression d'ATP dans les macrophages J774 ont permis de montrer que la réduction de l'efflux du cholestérol induit par l'incorporation d'acide élaïdique est ATP dépendante [45]. Afin de mieux explorer les mécanismes qui expliquent cette réduction d'efflux, Fournier, *et al.* posent une hypothèse suivant laquelle l'acide élaïdique réduirait l'efflux du cholestérol médié par ABCA1 en impactant la composition de la population d'eicosanoïdes qui modifieraient la phosphorylation des résidus sérine de ABCA1 et par conséquent son activité [45]. La même équipe a récemment rapporté en 2016 que l'incorporation d'acide eicosapentaénoïque dans les membranes de macrophages HMDM (human monocyte-derived macrophages) surchargés altère les fonctions de l'ABCA1 en diminuant l'activité ATPasique du transporteur via la voie de la protéine Kinase A (PKA) [35] confirmant ainsi les travaux de Hu *et al.* [11] dont les travaux ont été réalisés sur une lignée humaine de macrophages THP-1 surchargés en cholestérol. En effet, l'incorporation d'acide eicosapentaénoïque (EPA) dans la membrane de cellules est associée à de profonds remaniements de la composition en acides gras (AG) des phospholipides. Les travaux de Sayet, *et al.* [48] ont permis de constater une diminution des précurseurs des eicosanoïdes notamment l'acide arachidonique et l'acide di-homo gamma linoléinique, concomitante à une augmentation de l'EPA et de son produit d'élongation (l'acide docosapentaénoïque). L'utilisation de l'indométacine (inhibiteur de cyclooxygénase) abolit l'effet de l'EPA sur l'efflux du cholestérol dans un modèle cellulaire contrairement à l'acide nordihydroguaiarétique (inhibiteur de la lipoxigénase). L'équipe de biologie de l'unité interdisciplinaire Lip(Sys)<sup>2</sup> émet donc l'hypothèse suivant laquelle la réduction de l'efflux du cholestérol des macrophages humains en primoculture (HMDM : Human Monocyte-Derived Macrophages) serait due à une variation complexe de la population

d'eicosanoïdes, notamment les prostaglandines, influençant ainsi le fonctionnement de la protéine d'efflux ABCA1. Une variation d'efflux ABCA1 dépendante [35] suite à l'incorporation de précurseurs d'oxylipines tel que l'EPA a par ailleurs été montrée comme dépendant du type cellulaire [49], confirmant le rôle clé du modèle cellulaire utilisé pour les études d'efflux du cholestérol pouvant aussi expliquer l'hétérogénéité des résultats de la littérature portant sur les effets des AGPI sur cette fonction des macrophages. Sur la base de ces travaux, que ce soit dans un contexte physiologique et nutritionnel ou dans un contexte physiopathologique, on peut concevoir qu'une variation chronique de la nature et des concentrations des AG circulants puisse avoir une répercussion sur la composition en AG des membranes des cellules. Les modèles cellulaires d'étude (J774 et THP-1) dans cette thèse visent à simuler une modification chronique de la membrane des macrophages afin d'étudier les conséquences de l'incorporation membranaire de différents types d'AG sur l'efflux du cholestérol des macrophages. Les eicosanoïdes font l'objet d'études pour leurs propriétés pro ou anti-inflammatoires mais leur impact sur l'efflux du cholestérol est encore peu exploré surtout sur des modèles cellulaires tels que les macrophages. Afin de faire la lumière sur l'implication ou non des eicosanoïdes sur l'activité de la protéine d'efflux ABCA1, notre travail de thèse consistera à développer des techniques séparatives visant à quantifier ces molécules dans deux modèles cellulaires J774 et THP-1. A terme, l'objectif sera de mettre en lumière les possibles liens entre les fluctuations observées en termes d'efflux du cholestérol et les possibles biomarqueurs lipidiques impliqués que sont les eicosanoïdes.

## **Chapitre 2: Des lipides à la lipidomique**

La matière vivante est composée d'un ensemble de familles de molécules parmi lesquelles les lipides sont d'une importance capitale tant du point de vue structurelle que fonctionnelle. Le langage courant prête aux lipides la dénomination de "corps gras", une considération qui a d'ailleurs très vite été relativisée comme le fait remarquer M.E. Chevreul en 1823 en soulignant "combien l'expression de corps gras est vague, et l'impossibilité où l'on est d'en donner une définition scientifique" [50]. Le terme « Lipides » à ce jour regroupent des substances comme les huiles, les graisses, les cires, et bien d'autres composants cellulaires qui ont tous en commun la propriété d'être insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques tels que l'éther ou le chloroforme [50]. On dénombre environ 180 000 lipides différents [51] répartis dans 8 catégories de lipides [52]. Les lipides ne sont pas que dotés de propriétés et fonctions biologiques mais possèdent aussi différentes propriétés physico-chimiques. De nos jours, de nombreux nouveaux médiateurs sont découverts et leurs activités doivent être explorées. Les lipides oxydés les plus étudiés sont les eicosanoïdes et comprennent environ 100 médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique, acide eicosapentanoïque et acide dihomogamma linoléique [53].

## **I. Les fonctions biologiques des lipides**

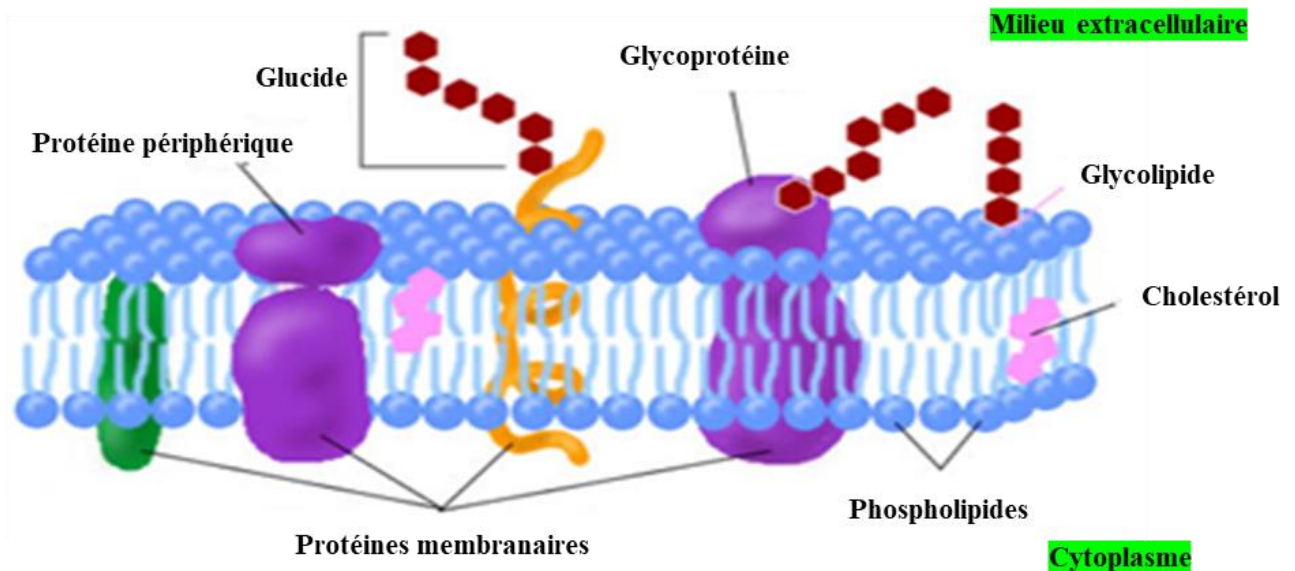
Les lipides contribuent à la dynamique des membranes cellulaires et sont des composés fondamentaux des voies de signalisation. Des liens très étroits entre un déséquilibre lipidique et certaines pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Tangier ont été démontrés [39,54,55]. Les lipides jouent essentiellement trois rôles majeurs dans l'organisme : un rôle énergétique, un rôle structural et un rôle dans la signalisation cellulaire.

### **1. Rôle énergétique**

Le tissu adipeux riche en triglycérides est une réserve énergétique importante dans laquelle puise l'organisme en cas de déficit de production d'ATP (Adénosine Triphosphate) issu de la phosphorylation oxydative du glucose. L'analyse de la composition en acides gras (AG)  $\omega 6$  et  $\omega 3$  du tissu adipeux est un marqueur biochimique qualitatif des graisses alimentaires. Par le biais de réactions biochimiques, les acides gras sont convertis en AG coenzyme A ou acyl coA. Cet acyl coA rentre dans la voie d'oxydation pour la production d'ATP.

## 2. Rôle structural

D'après le modèle de Singer et Nicolson [56] en 1972, une membrane cellulaire est composée d'une double couche phospholipidique avec des protéines et autres structures intégrées de façon asymétrique de part et d'autre (**Fig.2**). Cette asymétrie membranaire est fondamentale dans les fonctions (notamment la fluidité membranaire) que remplissent les membranes biologiques. Toute perturbation de cette asymétrie par incorporation de molécules d'acides gras impacte directement les processus physiologiques cellulaires [43]. Les membranes sont constituées (en poids sec de membrane) de 40% de lipides, 52% de protéines et 8% de glucides. Environ 70 à 90% de ces lipides membranaires sont constituées de phospholipides. Les lipides contribuent donc à l'architecture membranaire en lui conférant sa plasticité. Molécule faisant partie de l'architecture membranaire de la cellule (**Fig.2**), le cholestérol fera l'objet d'étude dans ce travail. En effet, l'abondance relative en cholestérol, phospholipides et acides gras contribuent à moduler la fluidité des membranes mais constitue le principal facteur de risque de l'athérosclérose. Les lipides interagissent avec les protéines membranaires à activité biologique telles que les enzymes, les transporteurs membranaires et les récepteurs hormonaux.



**Figure 2: Organisation de la membrane plasmique selon un modèle de Singer et Nicolson [56]**

### **3. Rôle fonctionnel**

En plus des fonctions structurales et énergétiques, les lipides interviennent dans de nombreux processus moléculaires contrôlés par des protéines associées aux membranes. Aussi leur implication dans différentes voies métaboliques et de régulation est indéniable. Les phospholipides sont directement impliqués dans la synthèse de médiateurs bioactifs dans la mesure où l'acide arachidonique en position 2 des PL est métabolisé via des voies d'oxydation en oxylipines à l'instar des eicosanoïdes. Certains travaux [57] ont permis de démontrer l'implication des AG  $\omega$ -3 dans la modulation de l'expression de gènes tel que la régulation de facteurs de transcription qui sont nécessaires pour l'homéostasie lipidique. A titre d'exemple, les Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)  $\alpha$  et  $\gamma$  sont des régulateurs clés dans l'homéostasie lipidique et sont activés par diverses molécules dont les eicosanoïdes [58,59].

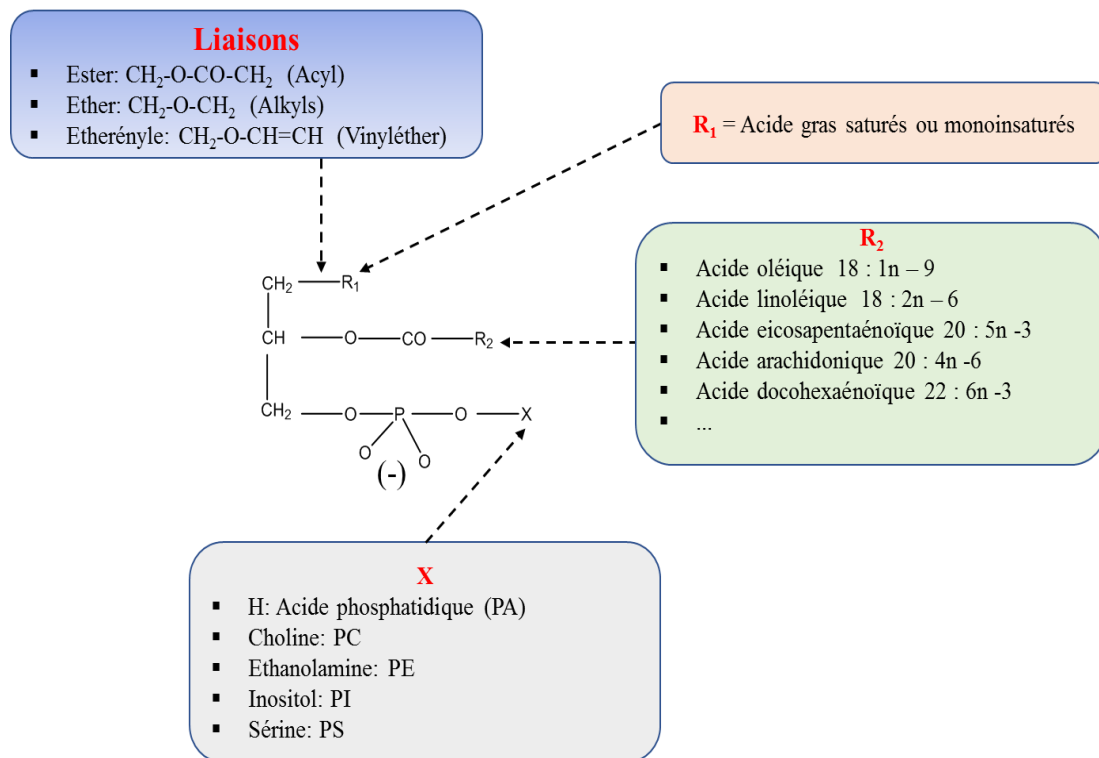
## **II. Classification des lipides**

La diversité structurale des lipides [60] reflète leurs nombreuses fonctions biologiques. Les lipides remplissent des fonctions structurales majeures notamment dans la genèse des membranes biologiques, jouant ainsi le rôle de barrière protectrice et isolante. Même si la classification des lipides ne fait pas l'unanimité de la communauté scientifique, la plus utilisée est celle présentée sur la plateforme Lipidmaps [52]. Suivant cette classification, ils sont regroupés en huit catégories (acides gras, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, stérols, prénols, saccharolipides et polycétides) qui sont elles-mêmes composées de classes, puis de sous classes et d'espèces moléculaires [52,61]. La ressemblance structurale de chaque catégorie est à la base de leur classification. La discrimination de classes est possible grâce à leur différence de polarité, de longueur de chaîne et donc de leur hydrophobicité (logP) de plusieurs ordres de grandeurs [62]. Nous ne présenterons ici que les glycérophospholipides et les acyles gras. En effet les glycérophospholipides de la membrane des cellules sont à l'origine des acides gras polyinsaturés dont certains sont eux-mêmes les précurseurs des eicosanoïdes.

### **1. Les glycérophospholipides**

Suivant la classification Lipid Maps, les glycérophospholipides sont également connus sous le nom de phospholipides (PLs) du fait de leur structure commune de base qui est le sn-glycérol-3-phosphate. Les glycérophospholipides, sont constitués d'un glycérol dont les deux fonctions alcool

(position *sn-1* et *sn-2*) sont estérifiées par des acides gras (sauf pour les plasmalogènes et les plasmanyl-phospholipides) et la troisième par un acide phosphorique lié ou non à d'autres molécules (alcools ou acides aminés) qui donnent l'identité et la caractéristique du glycérophospholipide. Parmi ces molécules, on trouve la sérine et parmi les alcools on trouve l'inositol, l'éthanolamine et la choline. On obtient ainsi la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylcholine (PC) et l'acide phosphatidique (PA). Il faut préciser que la position *sn-1* est très souvent occupée par des acides gras saturés ou monosaturés à la différence de la position *sn-2* où on retrouve des acides gras polyinsaturés (**Fig.3**). Les glycérophospholipides sont des composants prépondérants des membranes cellulaires chez les bactéries et les organismes supérieurs. Lorsqu'un groupement glycérol s'ajoute au motif de base des glycérophospholipides, on obtient des glycérophosphoglycérols (PG) et des glycérophosphoglycérophosphates (PGP). En revanche, lorsqu'un troisième glycérol acylé en position *sn-1'* et *sn2'*, on parle de glycérophosphoglycérophosphoglycérols communément connu sous le nom de cardiolipides (CL).



**Figure 3 : Principales caractéristiques structurales des glycérophospholipides des membranes cellulaires.**

PA : acide phosphatidique; PC = phosphatidylcholine ; PE = phosphatidyléthanolamine ; PS = phosphatidylinositol ; PS = phosphatidylsérine ; X = tête polaire ; L = liaison ; R1 = radical 1; R2 = radical 2.



## 2. Les acides gras

Les acides gras (AG) sont une classe de lipides (faisant parti de la catégorie des acyles gras) qui renferment une chaîne carbonée et une fonction acide carboxylique (R-COOH) à leur extrémité. En effet, il s'agit d'acides carboxyliques caractérisés par une répétition de groupements méthylène -CH<sub>2</sub>- formant une chaîne carbonée. La longueur de la chaîne carbonée est comprise entre 4 et 36 atomes de carbone avec présence ou non d'insaturations suivant les cas. On distingue en sous classes : les acides gras et conjugués, les octadécanoïdes, les eicosanoïdes, les docosanoïdes (les alcools gras, les aldéhydes gras), les esters gras, les amides gras (nitriles gras, éther gras, les hydrocarbures et hydrocarbures oxygénés) et les glycosyl acides gras (et autres acides gras). Nous nous intéresserons plus particulièrement aux eicosanoïdes dans ce travail.

## III. Les eicosanoïdes

### 1. Généralités

Les oxylipines désignent de manière générale des lipides oxygénés [63]. Il est donc important de préciser que les eicosanoïdes sont un sous-groupe d'oxylipines avec un rôle moteur dans la modulation de différents processus biologiques. En effet, Les eicosanoïdes sont des molécules-signaux lipidiques basés sur un squelette à 20 atomes de carbone, impliqués dans un grand nombre de processus physiologique et pathologique (inflammation, douleur...). Ils sont synthétisés à partir d'AG polyinsaturés à 20 carbones (en grec eikosa =20) dans presque toutes les cellules de l'organisme. Ce sont donc des molécules de 20 atomes de carbone [64], hydroxylés ou non, époxydés ou non à différentes positions de la chaîne carbonée avec pour certaines familles, des cycles à 5 (prostaglandines) ou 6 carbones (thromboxanes). Ils agissent de manière autocrine et paracrine car leur demi-vie est très courte (~min). Les précurseurs des eicosanoïdes sont des acides gras de la famille des oméga 3 ou oméga 6 [65] à 20 atomes de carbones à la différence des oxylipines qui proviennent à la fois d'acides gras à 18 (acide  $\gamma$ -Linoléique, l'acide  $\alpha$ -linoléique et l'acide linoléique) et 20 atomes de carbones. L'oxydation non enzymatique de l'acide linoléique aboutit à la sous-classe des octadécaénoïques qui regroupent les acides hydroxy/epoxyoctadécaénoïques (HODE/EpODE) [66]. Les octadécaénoïques comme les eicosanoïdes font tous partie des oxylipines. Le principal précurseur des eicosanoïdes est l'acide arachidonique (AA), un oméga 6 à 20 atomes de carbones et 4 doubles liaisons qui est relativement abondant dans les glycérophospholipides des membranes cellulaires. C'est un AG synthétisé à partir d'un AG essentiel : l'acide linoléique [43] (précurseur des oméga 6). Il peut aussi provenir

directement de l'alimentation (poissons, huiles végétales...). L'ampleur de l'implication des eicosanoïdes dans divers processus vitaux n'est plus à décrire.

L'acide arachidonique n'est pas le seul précurseur des eicosanoïdes, il en existe 2 autres :

- L'acide dihomogamma-linolénique (DGLA), un oméga-6 à 20 atomes de carbones et 3 doubles liaisons, dérivé de l'acide linoléique
- L'acide eicosapentaénoïque (EPA) ou acide timnodonique (car isolé pour la première fois à partir du thon), un oméga-3 à 20 atomes de carbone et 5 doubles liaisons, dérivé de l'acide alpha-linolénique.

## **2. Fonctions biologiques des eicosanoïdes**

Des découvertes en plein essor ont montré que différentes classes d'eicosanoïdes provoquent des réactions inflammatoires opposées agissant soit comme agent anti-inflammatoire, soit comme agent pro-inflammatoire [67]. Par exemple, le leucotriène B4 (LTB4) est un médiateur de l'inflammation aiguë et un vasoconstricteur tandis que l'acide époxy-eicosatriénoïque agit comme vasodilatateur. L'augmentation de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et des synthèses de PGE2 ont été systématiquement observées dans les plaques d'athérosclérose, conduisant à une production importante des eicosanoïdes [68,69]. La dérégulation de ces médiateurs lipidiques joue un rôle critique dans la pathogenèse et la progression de l'athérosclérose. Les eicosanoïdes favorisent, suppriment et/ ou résolvent l'inflammation dans de nombreuses conditions pathologiques, y compris la douleur, l'asthme, l'athérosclérose, le syndrome métabolique, les infections et la polyarthrite rhumatoïde [70–72]. Les prostaglandines sont une sous-famille de prostanoides, produites par plusieurs types cellulaires à partir de l'acide arachidonique et susceptibles d'effets divers sur les cellules productrices comme sur les cellules du microenvironnement au cours d'une signalisation cellulaire physiologique et/ ou du développement d'une pathologie. Ce sont des médiateurs bioactifs qui se lient au récepteur couplé à la protéine G en activant ou inhibant la formation de second messenger (l'AMPc) [73], se traduisant par une diversité de réponse cellulaire : contraction ou relâchement des muscles lisses, agrégation plaquettaire, augmentation ou résolution de la réponse inflammatoire. Les effets antagonistes des prostanoides sont largement décrits dans la littérature [67]. Wang, *et al.* [74] ont démontré qu'une diminution de la libération de PGE2 vasculaire conduit à une augmentation de la production de PGI2 endothéliale, ce qui entrave le développement de l'athérosclérose. L'implication de la PGE2 et de la PGI2 dans la régulation du flux de cholestérol cellulaire et des

lipoprotéines a été démontrée [75]. A titre d'exemple, la PGE1, la PGE2 et l'iloprost un analogue des prostacyclines, réduisent la synthèse du cholestérol et l'activité du récepteur LDL dans des leucocytes humains [76]. Une augmentation de l'AMPc cellulaire grâce à des inducteurs tels que la PGE1 et d'autres analogues de la prostacycline tel que l'iloprost, a pour conséquence une augmentation de l'efflux du cholestérol par les HDL3 dans un modèle de fibroblaste humain [75]. En revanche, une stimulation via la PGF2 $\alpha$  sur le même modèle est sans effet. L'impact de l'EPA sur une modification quantitative des prostanoides a été montré dans une lignée de macrophage murin RAW 264.7, avec une diminution de la PGE2 et une augmentation des PGE3 et PGD3 [38,55]. Certains médicaments anti-inflammatoires à l'instar de l'aspirine ciblent depuis des décennies de façon sélective la formation des prostanoides. Les eicosanoïdes ont tendance à ne produire des réponses que dans les cellules qui les produisent et dans les cellules voisines. Contrairement aux eicosanoïdes, de nombreuses autres hormones circulent dans tout l'organisme, induisant des effets dans tous les tissus qui présentent des récepteurs appropriés. C'est pourquoi on qualifie souvent les eicosanoïdes, de médiateurs locaux plutôt que d'hormones. Le tableau ci-dessous (**Tableau 1**) résume les effets des eicosanoïdes en fonction des organes.

**Tableau 1: Récapitulatif des fonctions des eicosanoïdes sur divers organes. [77]**

<b>Eicosanoïdes</b>	<b>Organes</b>	<b>Effets</b>
PGF2, TXA2, LTC4, LTD4	Vaisseaux	Vasoconstriction (hypertension)
PGI2 (le plus actif), PGE2, PGD4		Vasodilatation (Hypotension)
PGE, PGI2	Plaquettes	Anti-agrégant
TXA2		Pro-agrégant
PGF2, TXA2, LTC4, LTD4, LTE4	Bronches	Bronchoconstriction
PGE2, PGI2		Bronchodilatation
PGE2, PGF2	Intestin	Nausées, diarrhées
PGE2, PGF2		Motilité
PGE, PGI2	Estomac	Inhibition de la sécrétion gastrique
PGE2, PGF2		Motilité
PGE2, PGF2, TXA2	Utérus	Contraction
PGH2, PGE1, PGI2	Rein	Augmentation de la filtration rénale par augmentation du débit sanguin.
PGE1, PGE2	Hypothalamus et Hypophyse	Augmentation de la production d'ACTH, et de GNRH

### 3. Mécanisme d'action des eicosanoïdes

Les récepteurs des eicosanoïdes sont localisés à la surface des cellules. Les récepteurs sont spécifiques à chaque molécule : le récepteur EP1 est spécifique de la PGE1 tandis que EP2 est spécifique de la PGE2, et FP2 pour la PGF2. Globalement, leur liaison enclenche soit un accroissement, soit un abaissement de la concentration cytoplasmique d'un second messager (l'AMPc le calcium intracellulaire), l'activation d'une protéine kinase, ou une modification du potentiel membranaire. Les récepteurs des eicosanoïdes sont des récepteurs couplés aux protéines G qui déclenchent des réponses dépendantes de l'AMPc et des réponses dépendantes des phosphoinositides.

La liaison de l'eicosanoïde à son récepteur couplé à la protéine G (Gs ou Gi) induit respectivement une activation ou une inhibition de la protéine effectrice à l'origine de la réponse biologique. Nous allons présenter ici le cas où l'eicosanoïde se lie à un récepteur spécifique lié à la protéine Gs. Suite à cette liaison, il y a activation de l'adénylate cyclase et de la phospholipase C.

-L'adénylate cyclase médie la conversion de l'ATP en AMPc qui stimule la protéine kinase A à l'origine de la phosphorylation de la protéine effectrice.

-La phospholipase C (PLC) hydrolyse le phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate (PIP2) en inositol 2,4,5 triphosphate (IP3) et diacyl glycérol (DAG). Si le DAG est impliqué dans l'activation de la protéine kinase C, l'IP3 pour sa part se lie et active des canaux calciques IP3-dépendants situés sur le réticulum endoplasmique (RE). Les récepteurs de l'IP3 localisés sur la face cytoplasmique du RE sont des homotétramères qui forment un canal laissant sortir le  $Ca^{2+}$  lorsque chaque monomère fixe une molécule d'IP3. Il en résulte une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. L'élévation du  $Ca^{2+}$  libre intracytoplasmique entraîne l'activation d'un certain nombre de processus  $Ca^{2+}$  dépendants, comme l'activation de la calmoduline. Enfin, le complexe  $Ca^{2+}$ /Calmoduline active un très grand nombre d'enzymes tels que la MLCK (Myosin light chain kinase : à l'origine de la contraction des muscles lisses) ; l'AMPc phosphodiesterase ; la phospholipase A2 (à l'origine de l'hydrolyse de la liaison ester qui lie les précurseurs des eicosanoïdes en position *sn-2* aux glycérophospholipides). Le DAG pour sa part, active la protéine kinase C qui provoque divers effets (phosphorylation, différenciation cellulaire...).

## 4. Nomenclature

La plateforme Lipid Maps distingue au moins 15 sous-classes d'eicosanoïdes à savoir : les prostaglandines (PG), les Leucotriènes (LT), les Thromboxanes (TX), les lipoxines (LX), les acides Hydroxy/Hydroperoxyeicosatriénoïque (HETrE), les acides Hydroxy/Hydroperoxyeicosatétraénoïque (HETE), les acides Hydroxy/Hydroperoxyeicosapentaénoïque (HEPE), les acides epoxyeicotriénoïque (EET), les Hepoxylines, les levuglandines, les isoprostanes, les claculones, les isofuranes, les résolvines, les eicosa-1,2-dioxolanes et d'autres espèces apparentées. Les deux grandes familles d'eicosanoïdes les plus étudiées sont: les prostanoïdes (subdivisés en prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes) et les leucotriènes. La nomenclature des prostanoïdes est illustrée au travers de la **figure 4**.

### 4.1. Les prostaglandines

Elles sont caractérisées par un cycle pentagonal à 5 carbones. On les nomme par 2 lettres: PG, suivi d'une 3<sup>ème</sup> : A,B,C,D,E,F,G ou H (selon les groupements cétones ou alcools présents sur le cycle) puis un numéro en indice: 1, 2 ou 3 indiquant la série (c'est à dire le nombre de double liaisons sur les chaînes latérales) avec comme exemples la PGE3 ou la PGF2.

### 4.2. Les prostacyclines

Elles sont caractérisées par un cycle pentagonal à 5 carbones et un cycle pentagonal à 4 carbones et 1 oxygène. On les nomme par 2 lettres : PG suivi de la lettre I puis un numéro en indice : 1, 2 ou 3 pour la série. La plus connue est la PGI2 = Prostaglandine I2 = Prostacycline qui est le plus puissant vasodilatateur connu chez l'homme [67].

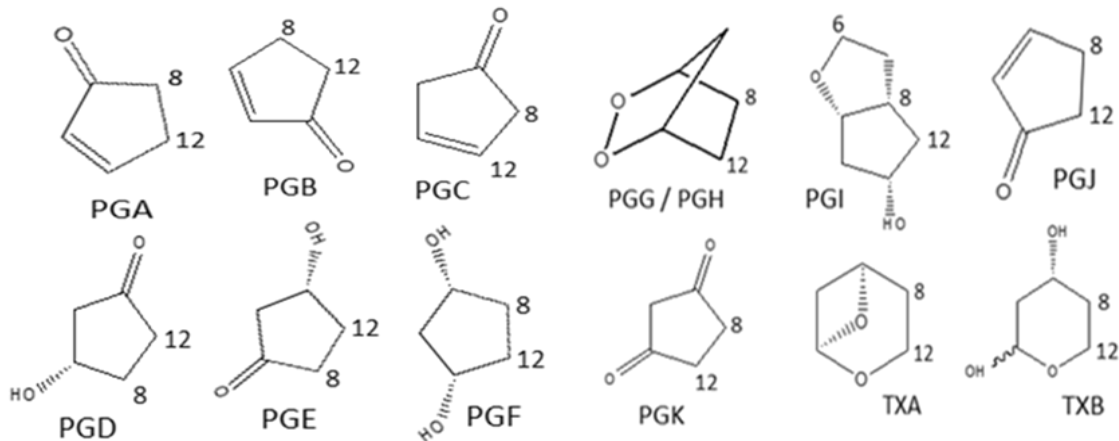
### 4.3. Les Thromboxanes

Ils sont caractérisés par un cycle hexagonal à 5 carbones et 1 oxygène. On les nomme par 2 lettres : TX suivi d'une 3<sup>ème</sup> lettre : A ou B (selon la nature du cycle) puis un numéro: 1, 2 ou 3 pour la série. Exemple : TXB2

En fonction du précurseur, on peut déduire la série à laquelle appartient l'eicosanoïde (**Tableau 2**).

**Tableau 2: Relation entre les précurseurs d'eicosanoïdes et la série des prostanoides produits**

Précurseurs	Prostanoïdes produits
<b>Acide dihomogamma-Linolénique (DGLA)</b>	Prostanoïdes de la série 1 (1 double liaison)
<b>Acide arachidonique (AA)</b>	Prostanoïdes de la série 2 (2 doubles liaisons)
<b>Acide eicosapentaénoïque (EPA)</b>	Prostanoïdes de la série 3 (3 doubles liaisons)



**Figure 4: Nomenclature des prostanoïdes montrant la variation du cycle, des groupements fonctionnels et leur position.**

La position et la nature du groupement fonctionnel implique la lettre qui vient après PG (prostaglandine) ou TX (thromboxane).

#### 4.4. Les leucotriènes

Les leucotriènes sont des eicosanoïdes produits par les leucocytes au cours de la réponse immunitaire et immuno-allergique [78]. Contrairement aux prostanoïdes, ce sont des dérivés d'acides gras à chaîne ouverte. Il n'y a pas de structure cyclique. Le nombre de doubles liaisons sur la chaîne hydrocarbonée est variable, tout comme la nature des groupements qui y sont fixés (hydroxyles, époxydes, acides aminés). La fonction acide carboxylique à l'extrémité de la chaîne est toujours conservée.

On les nomme par deux lettres : LT suivies d'une 3<sup>ème</sup> lettre : A, B, C, D, E ou F (selon les groupements fixés sur la chaîne hydrocarbonée) puis un numéro en indice : 3, 4 ou 5 indiquant la série (nombre de doubles liaisons). On distingue deux types de leucotriènes (**Fig.7**), selon qu'ils comportent une chaîne peptidique (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) ou non (LTA<sub>4</sub> et LTB<sub>4</sub>) [78]. Tous dérivent d'un précurseur commun, époxyde instable, le LTA<sub>4</sub> (**Fig.7**). Le **tableau 3** répertorie la série du leucotriène en fonction de son précurseur.

**Tableau 3: Relation entre les précurseurs d'eicosanoïdes et la série des leucotriènes produits**

Précurseurs	Leucotriènes produits
<b>Acide dihomogamma-Linolénique (DGLA)</b>	Leucotriènes de la série 3 (3 double liaison)
<b>Acide arachidonique (AA)</b>	Leucotriènes de la série 4 (4 doubles liaisons)
<b>Acide eicosapentaénoïque (EPA)</b>	Leucotriènes de la série 5 (5 doubles liaisons)

## 5. Voies de biogenèse

Au cours de l'inflammation, la phospholipase A2 (PLA2) cytosolique activée par un mécanisme de calcium dépendant ou indépendant, hydrolyse l'acide gras polyinsaturé (AGPI) précurseur des eicosanoïdes en position<sup>o</sup>2 des phospholipides membranaires. Il existe plusieurs isoformes de PLA2 regroupées en 16 groupes et sous-groupes, avec principalement six principaux sous types de PLA2. Tous les types de phospholipases A2 ( sPLA2, cPLA2, iPLA2, PAF-AH, LPLA2, AdPLA) ne se retrouvent pas forcément dans tous les types cellulaires et l'expression de certains dépend des processus de signalisation cellulaire [79] dans les tissus. L'AGPI libéré en position *sn*-2 est ensuite métabolisé par trois voies enzymatiques majeures : voie des cyclooxygénases, voie des lipooxygénases et la voie médiée par les enzymes du cytochromes P450 (**Fig.5**). Même si l'on sait que la voie enzymatique est celle prépondérante, il faut souligner que cet AGPI peut subir par voie non-enzymatique, une auto-oxydation du fait de son degré élevé d'insaturation et aboutir à des molécules comme les isoprostanes et les isofuranes [80–82]. Ces molécules issues de la voie non enzymatique sont des marqueurs du stress oxydatif [81] et impliqués dans plusieurs maladies comme l'asthme et la mucoviscidose [51]. A noter que ces oxylipines issues de la voie non-enzymatique sont formées dans l'espace intermembranaire des cellules avant d'être hydrolysées et relarguées dans le cytoplasme par la cPLA2 [83]. Les eicosanoïdes peuvent également être produits par voie non enzymatique à partir des radicaux libres [80].

Nous allons décrire brièvement les trois voies enzymatiques.

### 5.1. La voie des cyclooxygénases :

La cyclooxygénase (COX), protéine en forme de dimère de sous-unités de 70kD, est l'enzyme qui contrôle la genèse des prostanoïdes et se localise principalement dans le RE. Il existe deux formes de COX : la forme constitutive (COX-1) et la forme inductible (COX-2). A titre d'exemple, la

COX-2 peut être induite par les cytokines et le LPS (Lipopolysaccharides des bactéries). Nous reviendrons sur les modalités de l'induction de synthèse des eicosanoïdes par le LPS dans des modèles cellulaires dans la partie expérimentale de notre travail (**Partie II-Chapitre 5**).



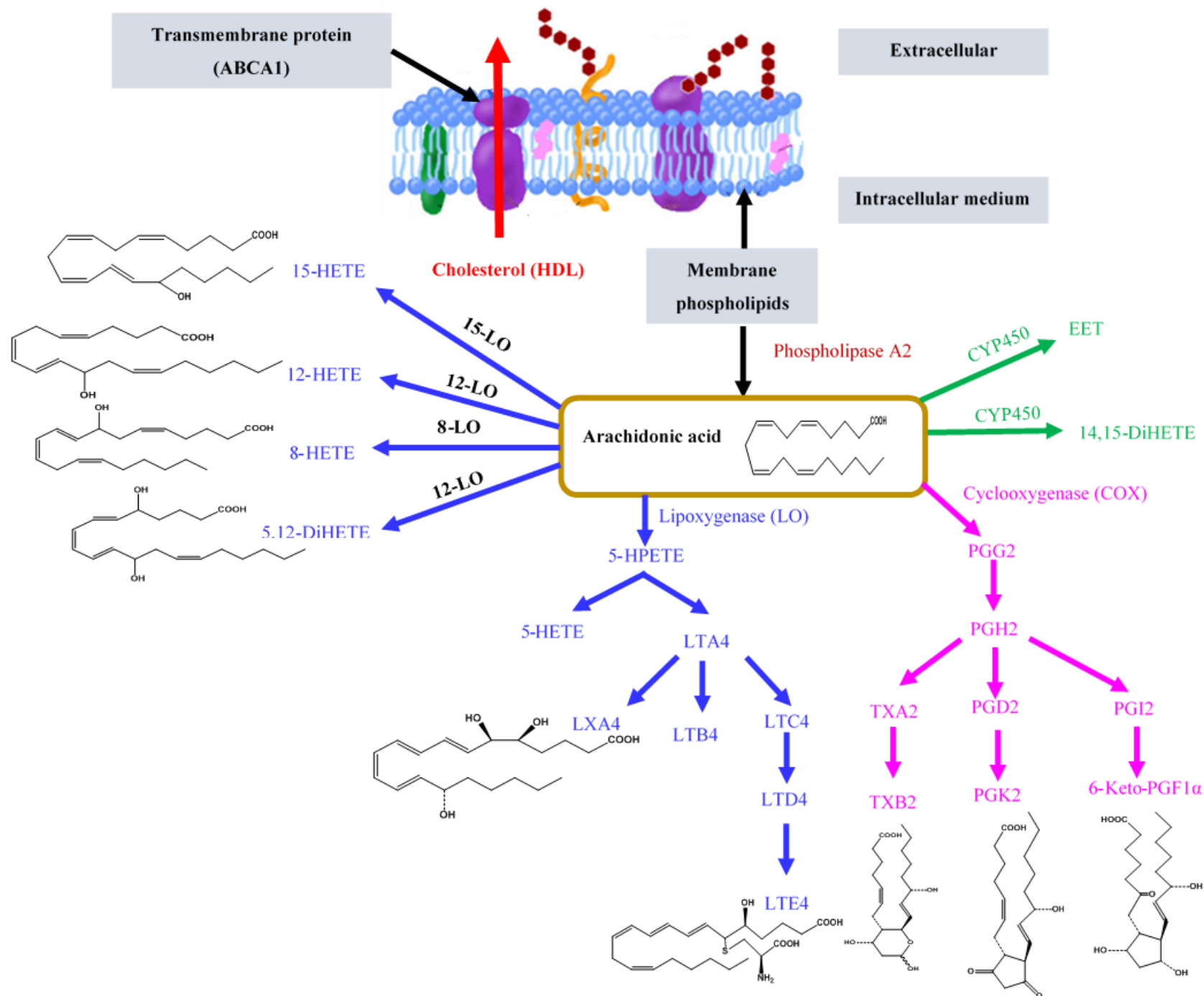
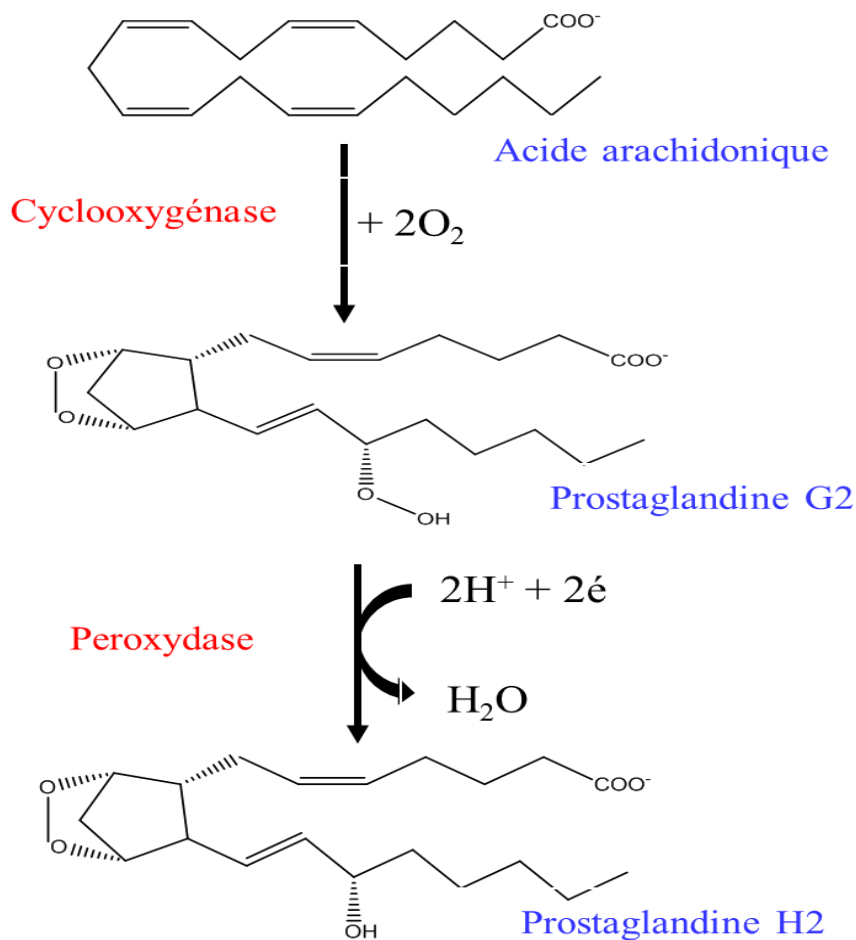


Figure 5: Schéma montrant la biogenèse des eicosanoïdes

Comme déjà évoqué plus haut, le point de départ est la mise à disposition de l'AA ou d'autres précurseurs à la COX. En considérant comme précurseur de départ l'AA, la première étape (**Fig.6**) est la formation d'un groupement hydroperoxyde après cyclisation de l'AA en cycle pentagonal avec un pont à 2 oxygènes. On obtient ainsi la prostaglandine G2. La deuxième étape consiste en la réduction de l'hydroxypéroxyde en hydroxyde pour donner la PGH2 à partir duquel sera généré l'ensemble des eicosanoïdes de la série 2 (**Fig.6**).



**Figure 6: Schéma de la biogenèse de la prostaglandine H2**

## 5.2. La voie des lipoxygénases

La lipoxygénase (LOX) médie des réactions d'oxygénation et d'oxydation des AGPI. Cette réaction est stéréosélective et conduit à la formation d'acides gras hydroperoxydés. A partir de l'AA (**Fig.7**), se forment les acides hydroperoxyeicosatétraénoïques (HpETE). Le HpHETE est

ensuite réduit pour donner des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE). Sous l'action d'une lipoxygénase, le HETE subit une époxydation en position 5 pour donner le premier leucotriène très instable qui peut donner ensuite les autres leucotriènes (**Fig.5 et 7**). La littérature rapporte différentes isoformes de LOX (5-LOX, 8-LOX, 12-LOX et 15-LOX) sur les voies de biogenèse [77,78,84] suivant la position d'ajout de l'hydroxyle ou l'époxyde sur le squelette carboné. La voie de la LOX est à l'origine non seulement des leucotriènes (LT) mais aussi des lipoxines (LX), des acides dihydroxyeicosatétraénoïques (DiHETE) et d'autres métabolites (**Fig.5**). Les LT sont des triènes conjugués formés initialement par l'action de 5-LOX. Selon le nombre d'insaturation du précurseur, les LT sont divisés en séries. A titre d'exemple, l'AA génère les LT série 4. La voie de la 5-LOX conduit à des 5-HpETE (9,14). Ces derniers peuvent être convertis en 5-HETE par l'action d'une enzyme hydroperoxydase ou en LTA4 par l'action d'une enzyme déshydrase. Le LTA4 forme par la suite le LTB4 par hydrolyse ou le LTC4 par conjugaison avec une molécule de glutathion ( $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine) en C6. Le LTC4 subit à son tour une série de réactions impliquant des enzymes du cycle  $\gamma$ -glutamyl. Ses réactions conduisent à la formation des LTD4 (cystéinyl-glycine), LTE4 (cystéine) et LTF4 ( $\gamma$ -glutamyl-cystéine) (21), (**Fig. 7**).

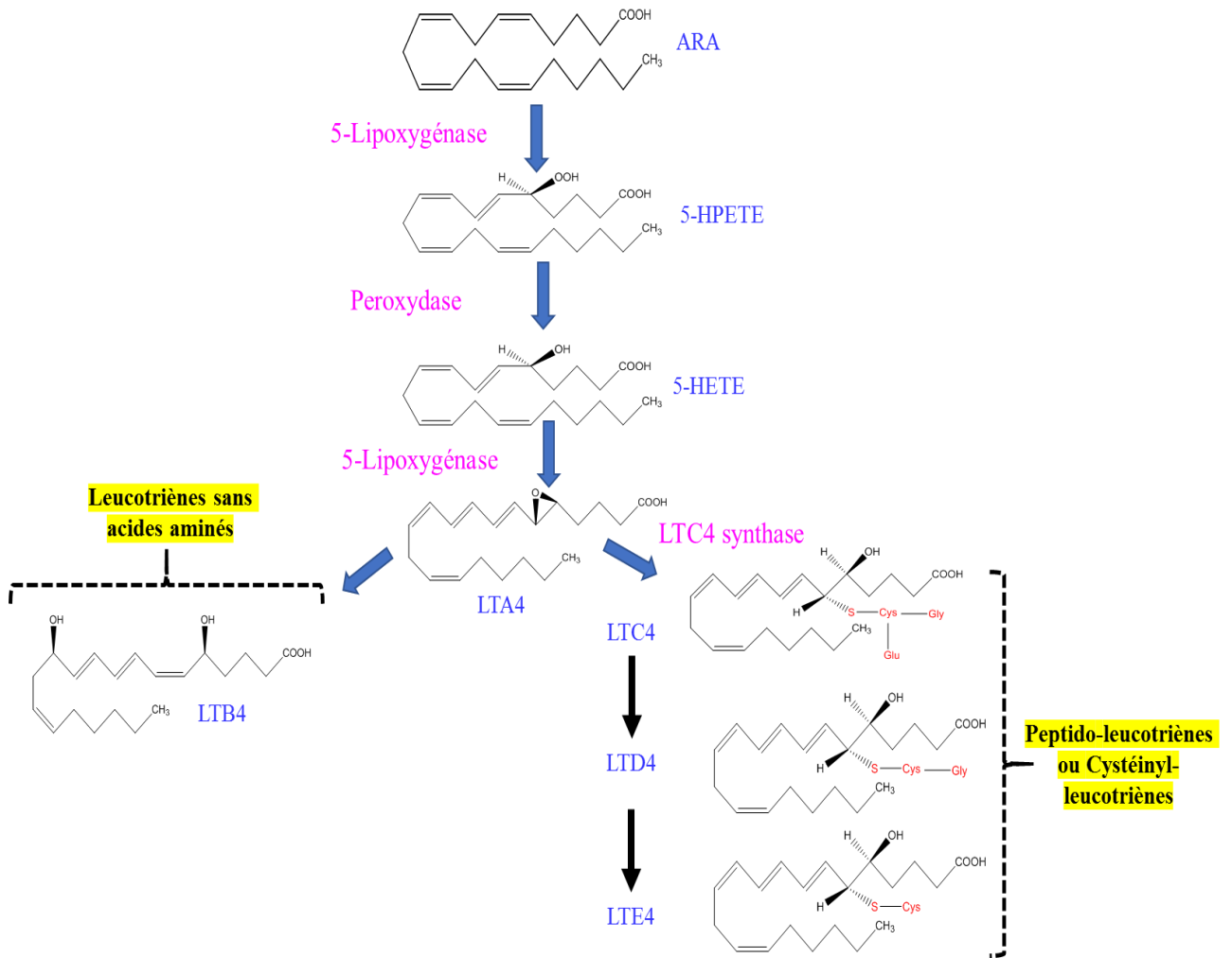


Figure 7: Schéma de la biogenèse de leucotriènes à partir de l'acide arachidonique

### 5.3. La voie du cytochrome P450

Les enzymes du cytochrome P450 produisent principalement des HETE, des DiHETE et des acides époxyeicosatriénoïques (EET) [66,82]. Les EET peuvent être hydrolysés par l'époxyde hydrolase soluble (sEH) pour donner des acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHET) [66].

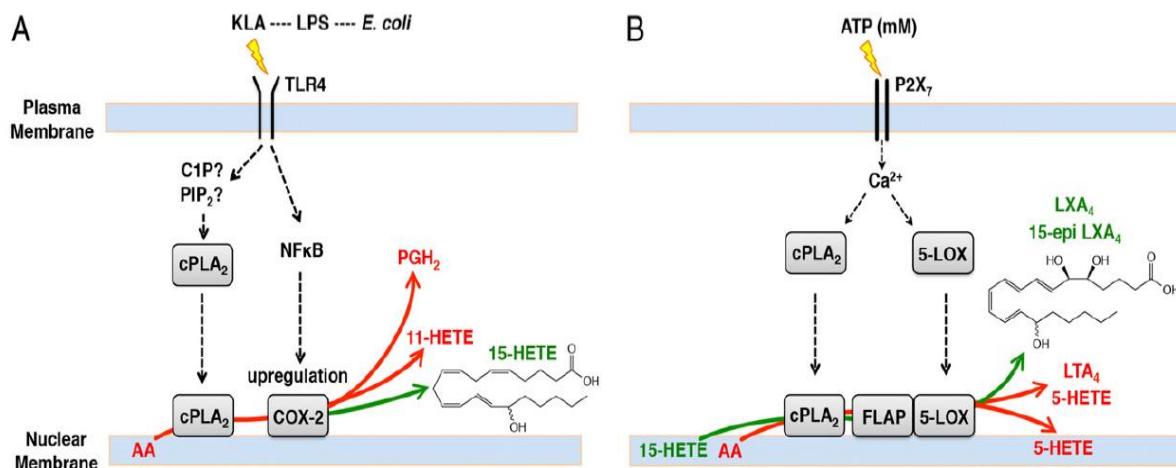
## 6. Stratégies de stimulation pour la production d'eicosanoïdes

Un tour d'horizon rapide de la littérature permet de se rendre compte que les eicosanoïdes sont impliqués dans la régulation de processus physiologiques et physiopathologiques médiés par les macrophages [72,85–87]. En effet, les eicosanoïdes sont produits par plusieurs types cellulaires [88] et leur variation quantitative et qualitative varie non seulement en fonction des cascades de signalisations cellulaires enclenchées mais aussi en fonction du type cellulaire. Afin de stimuler la production d'eicosanoïdes pour améliorer la fiabilité du dosage, plusieurs auteurs ont recours à une induction de l'activité phospholipase par des ionophores et/ ou une activation de l'activité cyclooxygénase par des endotoxines (LPS, KLA...) [40,85,89,90]. La plupart des modèles cellulaires se fondent sur les mécanismes médiés par la cPLA2 [40,85] à activité calcium dépendante mais aussi la iPLA2 dans plusieurs cellules circulantes de l'organisme [91] à activité calcium indépendante. Il existe donc à ce jour deux voies de stimulation : une première via des inducteurs de flux calcique intracellulaire et l'autre par des endotoxines.

### 6.1. Voie stimulée par les inducteurs du flux calcique intracellulaire

L'activité de la cPLA2 étant calcium dépendante, son activité n'est effective que si est atteint un niveau seuil de calcium intracellulaire. L'ATP active les canaux cationiques du récepteur ionotrope P2X, aboutissant à une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire entraînant la translocation de la cPLA2 aux membranes nucléaires d'où une libération de l'AA [38]. L'activation de TLR4 (Toll-Like Receptor) nécessite plusieurs heures pour l'induction de la COX-2 et donc pour une production ultérieure d'eicosanoïdes [38,85] tandis que la libération d'AGPI et la production d'eicosanoïdes après stimulation par l'ATP est rapide et prend 10 à 30 minutes [85,89]. Pour cette raison, on parlera de stimulation rapide par les ionophores à l'instar de l'ATP et de stimulation retardée comme avec le LPS [85] (**Fig.8**). L'AA est ensuite soit métabolisé par la 5-LOX en générant des métabolites de la 5-LOX ; soit par COX-1 et la COX-2 qui conduisent à une production de prostanoïdes. En résumé, l'augmentation du flux calcique intracellulaire permet indirectement une libération plus importante d'AA et donc par ricochet des eicosanoïdes. La biosynthèse des eicosanoïdes peut être stimulée par des agents

pharmacologiques [40] tels que: les agonistes naturels (fMLP : Formylmethionine-leucyl-phenylalanine); les ionophores calciques (ionomycine, A23187); les inhibiteurs de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (thapsigargine). Il est important de préciser que le A23187 et la thapsigargine agissent suivant différents mécanismes de stimulation cellulaire. Les ionophores tels que A23187 conduisent à une augmentation durable de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, ce qui induit une translocation massive des deux enzymes 5-LO et cPLA2 du cytoplasme à l'enveloppe nucléaire. En revanche, la thapsigargine inhibe le  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase endomembranaire et provoque une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des réserves intracellulaires ; entraînant ainsi un afflux massif de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire par les canaux calciques. En ce qui concerne le mécanisme, toutes ces molécules pharmacologiques stimulent la cellule en se fixant sur des récepteurs ionotropiques (P2X : récepteurs canaux) et les récepteurs aux purines et pyrimidines (P2Y : des récepteurs couplés aux protéines G). Les récepteurs P2Y sont impliqués dans la sécrétion des cytokines et par conséquent dans le développement des maladies inflammatoires. L'activation des récepteurs P2Y induit, par l'intermédiaire des protéines  $G_i$  ou  $G_s$ , deux voies de signalisation : l'induction d'une libération calcique intracellulaire et/ ou la répression ou la production d'AMPc. L'hétérogénéité des isoformes des récepteurs P2Y implique qu'il faut des agonistes spécifiques pour déclencher efficacement l'activité PLA2. Les récepteurs P2Y1, 2, 4, et 6 sont impliqués dans l'activation de la PLC et l'induction de l'IP3. Par conséquent, ils génèrent une libération de calcium dans le cytoplasme à partir du RE. Au contraire, l'activation des récepteurs P2Y12, 13 et 14 inhibe l'adénylate cyclase ce qui bloque la production d'AMPc. Toutefois la libération des AGPI des membranes cellulaires tel que AA, EPA, DHA est dépendant de la stimulation de P2X7 [89].



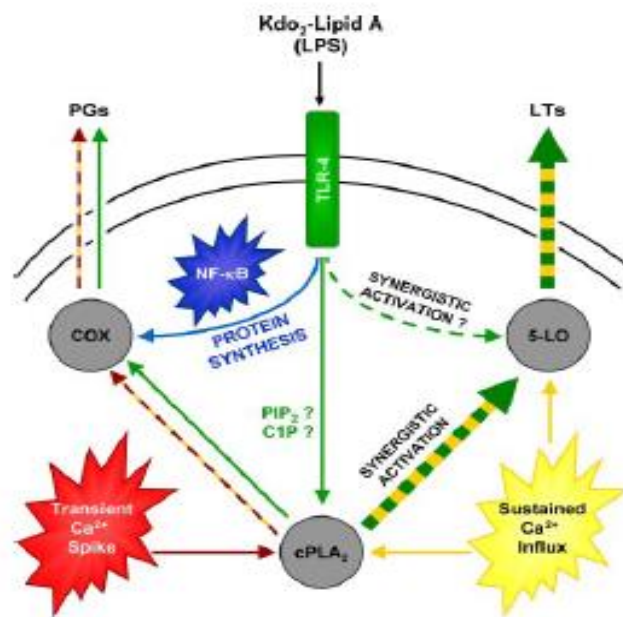
**Figure 8: Mécanisme de formation de quelques eicosanoïdes induite par la stimulation des récepteurs inflammatoires dans les macrophages [89].**

A : La stimulation retardée par le lipopolysaccharide (LPS) aboutit à une activation de la cPLA2 et du facteur transcriptionnel NFκB. La cPLA2 induit la libération de l'acide arachidonique qui est ensuite métabolisé en différents eicosanoïdes par la cyclooxygénase. Le NFκB stimule la surexpression de la COX-2. B : La stimulation rapide induite par l'ATP sur le récepteur P2X7 aboutit à une mobilisation plus importante du calcium. Ce calcium est impliqué dans la surexpression de la 5-LOX et l'activation de la cPLA2. Il en résulte un métabolisme orienté vers plus de molécules issues de l'action de la 5-LOX.

## 6.2. Voie déclenchée par l'action des endotoxines

La stimulation de macrophages RAW 264.7 [85,86,92] par des endotoxines (LPS ou KLA) induit une activation de l'activité cyclooxygénase et aussi, dans une certaine mesure, celle de la PLC à l'origine indirectement d'une augmentation du calcium intracellulaire. Ce calcium lié à la calmoduline déclenche l'activité de la PLA2. Des corrélations significatives ont été établies entre l'activité de la COX-2 et la liaison du LPS à la membrane de macrophage RAW 264.7 [85] et J774 [93,94]. La liaison du LPS sur le récepteur TLR induit la liaison du facteur transcriptionnel nucléaire NF-κB sur une zone de la région promotrice du gène codant pour la COX. Il s'agit de l'étape qui déclenche l'expression de la COX-2. Des travaux de stimulations de macrophages J774 avec du LPS pour comprendre le mécanisme d'expression de la COX-2 montrent que le clivage protéolytique de l'inhibiteur I-κB-α est l'une des conditions nécessaires à l'activation de NF-κB [95]. L'incorporation des AGPI dans la membrane de macrophages J774 a pour conséquence une augmentation de la liaison du LPS [93]. Cette liaison stimule l'activité de la COX-2 impliquée dans la genèse des prostaglandines. Certaines prostaglandines à l'instar de la PGE2 ont un effet rétrocontrôle négatif sur l'expression de la COX-2 [94]. La liaison du LPS induit non seulement l'activité de la COX-2 mais aussi celle de la iNO synthase aboutissant ainsi à une augmentation de produits nitrés formés (peroxynitrite, NO2). En effet,

l'expression et l'activité de la COX-2 est réprimée par la PGE2 de façon dose dépendante [94,96] mais aussi par les produits de l'iNOs [97]. Des expériences de stimulations de macrophages RAW 264.7 pour mimer les processus inflammatoires ont permis à Matthew W. Buczynski [85] et à Paul Norris [38] de montrer que la stimulation de P2X7 et TLR4 produit un effet synergique (**Fig.9**). En somme, une stimulation rapide (par les ionophores exemple : l'ATP) suivie d'une stimulation retardée (par les endotoxines à l'instar du LPS) permet de produire plus d'eicosanoïdes.



**Figure 9: Voies de synthèse des eicosanoïdes sous stimulation par des endotoxines (vert) et/ ou des agonistes favorisant un afflux transitoire de calcium (en rouge) ou un afflux durable de calcium (en jaune).**

Les eicosanoïdes dont il est question dans ce travail, sont des molécules lipidiques complexes et leur importance indirecte dans l'homéostasie est indéniable. Cependant il est difficile d'expliquer les différents mécanismes moléculaires en raison des rôles redondants des uns et des autres, ou d'opposition dans les processus biologiques. Pour tenter de relier la variation observée au sein d'une population complexe de lipides et les fluctuations au cours de processus inflammatoire, il est courant de recourir à la lipidomique. Il s'agit d'une approche en interface chimie-biologie qui tente d'établir non seulement la biogenèse des lipides mais aussi d'expliquer leur implication dans les réseaux cellulaires complexes quelle que soit l'origine.



## IV. La lipidomique

### 1. Historique et considérations générales

Comme déjà évoqué plus haut, pour avoir une vue la plus exhaustive possible sur les lipides et leur implication dans les processus biologiques, on fait recours à la lipidomique.

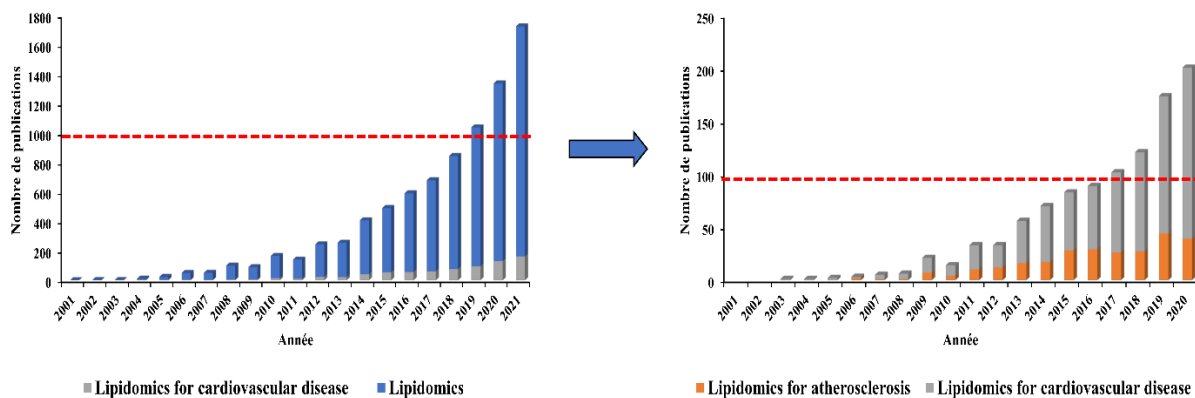
**La lipidomique** est une approche globale dans l'accès à une connaissance exhaustive des molécules lipidiques présentes dans le domaine du vivant. Autrement dit, c'est l'étude à grande échelle des espèces moléculaires de lipides, visant à aborder l'identification, la distribution cellulaire et tissulaire des lipides ainsi que leur implication dans la signalisation cellulaire et des voies métaboliques [60,98–100]. Parlant de la nuance entre la lipidomique et la lipidologie, il faut préciser que la lipidologie est littéralement la science des lipides, tandis que la lipidomique contient en elle une vision d'objectifs qui consiste à vouloir accéder à la détermination de l'ensemble des structures lipidiques existantes et leurs fonctions. Autrement dit, c'est l'étude des comportements physico-chimiques des lipides, de leurs interactions avec les autres molécules du vivant comme les protéines par exemple, leur métabolisme et enfin leur implication dans l'ensemble des processus biologiques. Si l'on peut se réjouir de la grande diversité du lipidome naturel en lien avec les multiples fonctions biologiques associées, leur analyse représente un véritable défi analytique [60] comme en métabolomique. En 2005, Serhan définit la lipidomique comme étant "le décodage systématique de l'information liée aux lipides dans les systèmes biologiques"[101]. En somme, la lipidomique est une branche de la métabolomique qui permet de caractériser la structure des lipides potentiellement importants pour le suivi d'une pathologie ou processus cellulaire[102], la prévention et/ ou la thérapie d'une maladie.

En fonction des orientations sur la quantification spatio-temporelle des lipides, deux volets se dégagent : une lipidomique membranaire (c'est-à-dire l'identification et le profilage des lipides membranaires) et une lipidomique dite des médiateurs qui prend en compte l'identification et le profilage des molécules dérivées des lipides membranaires dont les eicosanoïdes.

Suivant les approches impliquées pour la recherche d'une ou de molécules lipidiques connues ou non, on distingue : la lipidomique ciblée et la lipidomique non ciblée. Chacune de ces deux approches de la lipidomique a ses caractéristiques, ses avantages et ses inconvénients.

- **La lipidomique ciblée** est utilisée lorsqu'on souhaite étudier des lipides ou classes de lipides spécifiques en ciblant les ions précurseurs d'un lipide spécifique et ses ions fragments produits [98,100,103] après fragmentation dans un spectromètre de masse équipé d'un analyseur de type triple quadripôle, et en utilisant un mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) ou SRM (Selected Reaction Monitoring) [99] qui permet d'avoir une haute sensibilité et une bonne sélectivité. Une alternative à ce mode de détection en passant par un mode DDA (Data Dependent Acquisition) a été développée dans cette thèse.
- En revanche, **la lipidomique non ciblée** permet d'analyser une large gamme de métabolites de façon concomitante sans à priori. Dans ce cas, un spectromètre de masse haute résolution (HRMS) est nécessaire pour déterminer la masse exacte et discriminer de façon précise chaque espèce lipidique et les espèces isobares. Plusieurs analyseurs sont utilisés pour l'analyse des lipides par approche non ciblée dans les échantillons biologiques. Entre autre, nous pouvons citer : le temps de vol (QTOF), l'Orbitrap® ou résonance cyclotronique à transformée de Fourier [99,100].

Le terme Lipidomique a été ajouté sur la plateforme PubMed pour la première fois en 2003 [104] et la recherche en lipidomique a connu une forte expansion à partir de 2014 pour dépasser la barre des 1000 publications en 2019 (**Fig.10**). La lipidomique est devenue de nos jours une approche incontournable dans la découverte rapide de biomarqueurs lipidiques et/ ou de mécanismes permettant d'expliquer le développement de pathologies à l'instar des maladies cardiovasculaires. D'ailleurs, une évolution exponentielle de la lipidomique appliquée aux maladies cardiovasculaires est observée depuis les années 2013 avec une fréquence dépassant les 100 publications par an depuis 2017 (**Fig.10**). Enfin, la lipidomique appliquée à l'athérosclérose représente plus de quart des articles traitant de la lipidomique appliquée aux maladies cardio-vasculaires, montrant l'ampleur de l'intérêt à la compréhension de cette maladie.



**Figure 10: Evolution de l'expansion de la lipidomique dans la recherche en général et dans les maladies cardiovasculaires tel que l'athérosclérose.**

Les histogrammes représentent le nombre de publications par année faisant usage de la lipidomique. Ces données ont été extraites de PubMed.

La lipidomique nécessite à la fois des outils d'analyse en biologie et en chimie. Nombre de techniques de dosages sont décrites dans la littérature dans le but d'explorer les maladies inflammatoires ou d'identifier des biomarqueurs tels que les eicosanoïdes.

## **Chapitre 3: Les méthodes d'analyse des eicosanoïdes**

## I. Historique et évolution dans l'analyse des eicosanoïdes

Les eicosanoïdes comme définis plus haut sont des médiateurs bioactifs avec des rôles redondants ou d'opposition, aboutissant le plus souvent à une réponse ciblée qui n'est que la résultante de toute une cascade de signalisation cellulaire issue des actions des uns et/ ou des autres. En somme, c'est l'équilibre global entre différentes espèces oxygénées d'AGPI qui semblent moduler de nombreux processus biologiques. En effet, il est difficile d'expliquer les mécanismes moléculaires impliqués dans les différents processus biologiques en étudiant un nombre limité d'espèces d'eicosanoïdes, chose que font jusqu'alors les techniques de dosages immunologiques. Bien que ces techniques de dosage permettent une quantification avec une haute sensibilité [105,106], elles sont néanmoins confrontées à une disponibilité limitée des anticorps spécifiques, des problèmes de sélectivité et de spécificité des anticorps disponibles [40,51,66,107]. Il en résulte des problèmes de reproductibilité lors des dosages des eicosanoïdes [108].

Face à une disponibilité limitée d'anticorps dirigés contre les eicosanoïdes et des problèmes de spécificité, la séparation en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [77,109] rendue possible en passant par une étape de dérivatisation des AGPI, a permis de couvrir une gamme plus importante d'eicosanoïdes avec des seuils de détection de l'ordre du pg/mL [84,110,111]. En revanche, les EET ne peuvent être dosés par GC-MS, *idem* pour les eicosanoïdes mixtes à l'instar des peptido-leucotriènes car il n'y a pas de stratégie de dérivatisation connue pour ces molécules [112,113], excepté qu'elles soient désulfurées avant la dérivatisation [114]. Autrefois, la caractérisation du LTC<sub>4</sub> qui est un sulfidopeptide leucotriène passait par la dégradation de la molécule en d'autres composés analysables par spectrométrie de masse en utilisant diverses réactions biochimiques pour remonter à sa structure réelle [114]. Malgré les résultats encourageant de dosage des eicosanoïdes par chromatographie gazeuse pour comprendre certaines pathologies [110,111], les trois fonctions labiles des eicosanoïdes (carboxylique, hydroxyle et cétone) complexifient l'analyse puisqu'il faut passer par l'étape de dérivatisation. Cette dernière étape est non seulement chronophage, mais se fait avec de potentiels risques de perte d'échantillons et surtout de dégradations de ces molécules. L'électrophorèse capillaire a été aussi utilisée comme technique de quantification des EETs/DHETs [115] mais se révèle insuffisante en termes de performances de séparation.

Pour pallier tous les problèmes sus-cités, des méthodes en chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse en tandem ont été utilisées pour

l'identification et la quantification des eicosanoïdes avec un gain de temps considérable, une meilleure sensibilité et spécificité, et surtout couvrant une plus large gamme de médiateurs d'intérêts. L'essor de la chromatographie liquide et l'amélioration des méthodes de traitement d'échantillons et/ ou de détection des eicosanoïdes [40,51,65,82,116–120] a permis de réelles avancées dans des approches pluridisciplinaires pour la compréhension du développement de plusieurs pathologies [40,51,65,118,121], entre autres l'athérosclérose [39,40], la maladie d'Alzheimer [54], le cancer [122], l'asthme, le diabète [123] etc. La plupart des techniques en chromatographie développées à ce jour pour l'analyse des eicosanoïdes, ont été réalisées en chromatographie liquide à polarité de phases inversée (RP-HPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem équipée d'une source d'ionisation électrospray (ESI) fonctionnant en mode négatif et une analyse en mode « multiple reaction monitoring » (MRM). L'ESI-MRM a été utilisée pour la première fois en 1996 par Isakson, *et al.* [124] pour l'analyse de 14 eicosanoïdes dans un échantillon biologique.

## **II. Les techniques de préparation d'échantillons**

La préparation d'échantillon consiste à extraire les analytes d'une matrice complexe. Elle est très chronophage avec plusieurs étapes suivant la technique utilisée et sources d'erreurs entachant le résultat de l'analyse. Une bonne préparation d'échantillon influe directement sur la limite de détection, la reproductibilité et la répétabilité de l'analyse. Elle conditionne donc la qualité des résultats. Il convient de bien optimiser cette étape pour simplifier la complexité des échantillons cellulaires afin d'améliorer le rendement d'extraction.

### **1. La chromatographie par immuno-affinité**

La chromatographie d'affinité permet de séparer les composants d'un mélange en se basant sur les propriétés d'interactions biologiques. De toutes les molécules d'un mélange complexe, seuls les composés d'intérêts vont se lier de manière réversible à des ligands spécifiques fixés sur la phase stationnaire. Après élution des autres interférents, on détache le ou les composés d'intérêts. Le choix du ligand spécifique en fonction de la structure des molécules est très important pour obtenir une bonne purification.

La chromatographie par immuno-affinité peut être utilisée comme une technique de préparation d'échantillons [125] pour ne retenir que les composés d'intérêts dans un échantillon complexe.

Une étude comparative entre la chromatographie sur couche mince (TLC) et la chromatographie par immuno-affinité en amont de la GC-MS/MS a permis de démontrer la spécificité en termes d'extraction de la technique d'immuno-affinité et permis de conclure quant à l'hétérogénéité en termes d'isoformes de 8-iso-PGF2 $\alpha$  présent dans l'urine [110]. En effet, par sa grande spécificité dérivant de l'usage d'anticorps spécifiques immobilisés sur la phase stationnaire et dirigés contre des eicosanoïdes spécifiques, ce type de chromatographie se trouve limitée par la disponibilité de colonnes spécifiques sur le marché et par le nombre restreint d'eicosanoïdes pouvant être analysés simultanément. La SPE (Solid Phase Extraction) et la LLE (Liquid Liquid Extraction) sont de nos jours les méthodes les plus utilisées pour extraire les eicosanoïdes [108] dans des échantillons cellulaires ou fluides biologiques. Pour s'affranchir des problèmes de seuil de détection de molécules dans des matrices complexes, il est courant de procéder par préconcentration de l'échantillon.

## **2. L'extraction liquide-liquide**

L'extraction liquide-liquide (LLE) repose sur la différence de partage d'un soluté entre une phase aqueuse et une phase organique non miscible. Cette partition est basée sur le coefficient de partage de l'analyte entre la phase aqueuse et un solvant organique à une température donnée. Le coefficient de partage dépend de la solubilité de l'analyte dans chacune des deux phases. Le rendement d'extraction dépend de plusieurs paramètres à savoir : propriétés physico-chimiques des molécules à extraire, le nombre d'extractions successives et la solubilité de l'analyte dans les différents solvants utilisés. La LLE n'exige non seulement pas d'équipement particulier, mais aussi elle n'est pas sélective et requiert de grandes quantités de solvants organiques non miscibles à l'eau (chloroforme, hexane, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle). Certaines extractions liquide-liquide réalisées à base d'hexane/isopropanol spécifiques à l'extraction d'eicosanoïdes dans le cerveau sont courantes dans la littérature [108]. Certains solvants comme l'hexane malgré leur capacité d'extraction, sont très toxiques et sont de nos jours abandonnés dans les protocoles d'analyses. La très faible diversité structurale des eicosanoïdes implique des interactions spécifiques à prendre en compte pour le choix des solvants des méthodes LLE.

Les méthodes de LLE couramment utilisées pour les eicosanoïdes sont la méthode suivant Folch et celle suivant Bligh Dyer [108]. La procédure d'extraction suivant Folch utilise un protocole basé sur du chloroforme/méthanol dans un rapport de 2 :1 ajouté à 20 fois la quantité d'échantillon. Ensuite un ajout d'eau est utilisé pour favoriser le déphasage [126]. Il est courant de recourir aux sels à cette dernière étape pour favoriser une plus grande solubilité de certains

composés d'intérêts vers la phase organique. En utilisant un protocole modifié suivant Folch, Basselin, *et al.* ont démontré que l'activité cérébrale de cPLA2 augmente chez les Souris déficientes en transporteur de la sérotonine à la différence de l'activité cyclooxygénase et les concentrations de prostaglandine PGE2,PGF2 $\alpha$  et de thromboxane TXB2 qui étaient réduites [127]. En ce qui concerne l'extraction suivant Bligh and Dyer, une solution respectant un rapport 2:2:1,8 chloroforme/méthanol/eau doit être utilisée pour extraire les lipides en général dans la couche inférieure (organique). Le chloroforme et l'eau sont utilisés dans la dernière étape suivant Bligh et Dyer pour obtenir la séparation en deux phases. En regardant de près l'extraction suivant Folch, on remarque que Bligh et Dyer ont en réalité adapté la procédure définie par Folch pour diminuer la quantité de solvant utilisé ainsi que le temps d'extraction et d'analyse. L'extraction des eicosanoïdes suivant Bligh & Dyer est la plus utilisée pour l'extraction des eicosanoïdes [66]. D'autres méthodes alternatives implique l'éther, acétone/chloroforme, hexane-isopropanol et éthyl acétate/ethanol [66,128] ou encore l'acétate d'éthyle acidifiée [129]. La LLE par mélange avec un autre solvant non miscible tel que l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'hexane-acétate d'éthyle montrent un bon rendement pour les PGs, HETEs, et EETs mais pas pour les composés hydrophiles comme le cystéinyl-leucotriène [51]. L'analyse de produits d'oxydation d'eicosanoïdes pour explorer le lipidome de cerveaux de Souris dans le cadre de la maladie d'Alzheimer ont permis de montrer que les composés d'intérêt se retrouvaient majoritairement dans la phase aqueuse malgré le fait qu'en général, la phase organique est celle qui est analysée après évaporation [54]. Des rendements d'extraction en eicosanoïdes allant de 17 à 54 % avec des coefficients de variation de l'ordre de 12-46 % ont été obtenus par LLE dans une étude de recherche de biomarqueurs impliqués dans l'athérosclérose [39]. L'évaluation des performances de la LLE et de l'extraction en phase solide à partir d'un mélange de 7 eicosanoïdes (Tetranor PGE-M, 2,3-Dinor-8-iso-PGF2 $\alpha$ , 8-iso-PGF2 $\alpha$  ; 2,3-dinor-TXB2 ; 11-dehydro TXB2 ; LTE4 et 12-HETE) pour une analyse ciblée sur des urines, a montré de meilleurs rendements par la LLE pour certains eicosanoïdes (Tetranor PGE-M, 11-dehydro-TXB2 et le 12-HETE) [130]. Une influence du pH sur le rendement obtenu en LLE a été mis en lumière dans cette étude [130]. Enfin la LLE est le plus souvent utilisée pour l'extraction d'eicosanoïdes de tissus, d'urine, de plasma humain [87,108] et très rarement sur des surnageants cellulaires. Une étude comparative des performances d'extraction des eicosanoïdes entre la LLE et la SPE sera présentée dans le **chapitre 4 de la partie II** de notre travail. Même si l'efficacité de la LLE pour extraire une population



hétérogène de lipides n'est plus à démontrer, elle semble moins performante pour l'extraction des eicosanoïdes [39].

### **3. L'extraction en phase solide ou SPE**

Les composés à extraire par SPE sont immobilisés sur une phase stationnaire contenue dans une cartouche puis récupérés lors de l'élution. Les mécanismes de rétention impliqués lors de l'extraction en phase solide (SPE) sont ceux de la chromatographie liquide. Plusieurs types de chromatographie peuvent donc être réalisés par SPE en fonction de la nature de la phase contenue dans la cartouche. Au vu des propriétés physico-chimiques et de la structure des eicosanoïdes, nous n'aborderons ici que les cartouches remplies de phases stationnaires de chromatographie liquide à polarité de phases inversée. Très souvent, les études d'extractions des eicosanoïdes sont menées dans la littérature par des cartouches remplies de phases stationnaires à polarité de phases inversée (C8, C18 avec ou sans endcapping) [40,131–133] et par des cartouches à base de polymères à l'instar du styrène divinylbenzène [85] ou issu d'une copolymérisation de divinylbenzène avec un monomère polaire (le N-vinylpyrrolidone) pour la phase Oasis HLB (HLB : Hydrophilic–Lipophilic Balance) [39,134,135]. Très peu d'études ont eu recours à des cartouches SPE d'échanges d'ions pour l'extraction des eicosanoïdes [130]. Le développement de supports à base de polymères a pour but d'amplifier les mécanismes de rétention basés sur des interactions hydrophobes mais aussi polaires par augmentation non seulement de leur surface spécifique mais aussi l'incorporation de groupements polaires intégrés ou groupements fonctionnels. Cependant, ces interactions ne sont pas suffisamment sélectives conduisant à une forte rétention de composés pouvant interférer au cours de l'analyse chromatographique.

La SPE est une technique analytique qui se déroule en plusieurs étapes (**Fig.11**) qui sont :

#### **- Le conditionnement et l'équilibration de la cartouche :**

Cette étape permet de se débarrasser d'interférents de synthèse encore présent sur la cartouche afin de favoriser les interactions entre l'analyte et la phase stationnaire. Elle permet aussi une meilleure mouillabilité des frittés. En chromatographie liquide à polarité de phases normale, le conditionnement se fait généralement avec l'hexane, l'heptane, ou le dichlorométhane et en chromatographie liquide à polarité de phases inversée, on a plutôt recours au méthanol ou à l'acétonitrile. L'étape d'équilibration avant chargement de

l'échantillon doit respecter quelques critères : le solvant utilisé doit être miscible et très proche du solvant dans lequel se trouve l'échantillon. L'eau est le solvant le plus utilisé.

#### - **Le chargement de l'échantillon :**

L'échantillon est déposé et les analytes d'intérêts comme les interférents vont interagir avec la phase stationnaire. Les impuretés n'ayant aucune affinité avec l'adsorbant ne sont pas retenues mais il existe un risque que les analytes ne soient pas retenus. A part le solvant de chargement et la nature de la phase stationnaire, un autre paramètre qui influe sur la rétention du composé d'intérêt est la vitesse d'écoulement.

#### - **Le lavage**

Cette étape consiste en l'élimination d'impuretés et de composés interférents par ajout d'un solvant de lavage. En réalité, les interférents seront éliminés en utilisant un solvant qui permet de les solubiliser sans rompre les interactions spécifiques ou non entre les analytes d'intérêt et la phase stationnaire. De nos jours, il existe des cartouches pour lesquelles, à cette étape, seuls les analytes sont élués, les interférents restant accrochés pendant le lavage. Le choix de ce solvant conditionne aussi les pertes éventuelles ou non en analytes d'intérêts

#### - **Le séchage**

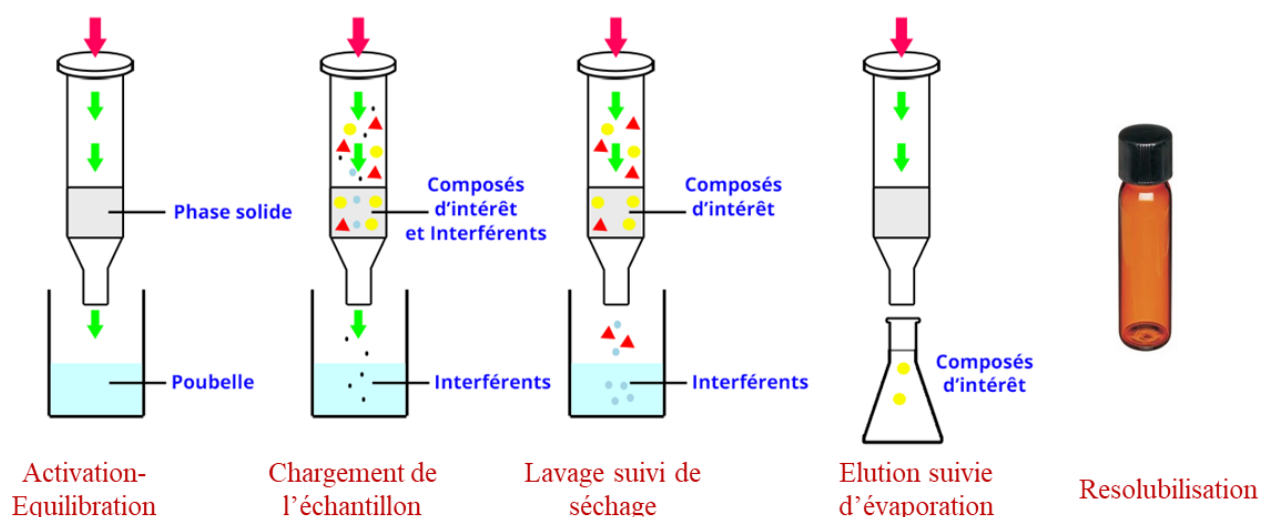
Cette étape permet l'élimination de traces de solvant de lavage avant l'élution. Même si cette étape rallonge le temps d'analyse, elle permet de se débarrasser des traces du solvant de lavage [108,136,137]. Il s'agit d'une étape qui est très souvent omise. Au cours de l'étape d'extraction, les eicosanoïdes sont des molécules capables de s'oxyder en d'autres métabolites et ceci à n'importe quelle étape de la procédure. L'impact de cette étape sur le rendement d'extraction n'a donc pas fait l'objet d'étude dans notre protocole qui sera présenté dans le **chapitre 4 de la partie II**. D'ailleurs dans une étude de dosage de prostanoides par GC-MS/MS, les auteurs ont souligné le fait que les concentrations de TXB2 importantes obtenues dans le plasma seraient probablement dues à sa production *ex-vivo* au cours de l'échantillonnage et des étapes d'extractions [111].

#### - **L'élution**

Cette étape permet d'éluier les composés d'intérêt avec un solvant ou mélange de solvant adéquat. Ce dernier doit avoir le maximum d'interactions avec les analytes et le moins possible avec les autres interférents qui peuvent rester adsorbés.

## - L'évaporation et la resolubilisation de l'extrait

Après évaporation de l'éluat, il est courant de minimiser le volume de resolubilisation afin d'obtenir un important facteur de concentration. Le solvant de resolubilisation doit être compatible avec la méthode d'analyse en chromatographie et/ ou en spectrométrie de masse.



**Figure 11: Schéma récapitulatif des étapes d'une extraction en phase solide.**

La quantité d'analytes dans l'éluat dépend de la complexité de la matrice. Dans diverses matrices telles que le cerveau, les métabolites de l'acide arachidonique existent à des concentrations extrêmement faibles. Par conséquent, une extraction est nécessaire pour augmenter la spécificité et la sensibilité de détection des molécules à doser [108]. La diminution du pH par acidification permet d'augmenter l'efficacité mais il est important de souligner que les eicosanoïdes peuvent être altérés au cours de la procédure d'extraction. Des pH extrêmes devront donc être évités [138]. Différents prétraitements de l'échantillon tel que le broyage et l'homogénéisation peuvent aussi altérer les eicosanoïdes aboutissant le plus souvent à d'autres espèces d'oxylipines. Afin de limiter ce phénomène, certains antioxydants tels que du BHT (butylatedhydroxyl toluene) [38,121,134], des inhibiteurs de métalloenzymes tels que l'EDTA (ethylenediaminetetra-acetic acid) [97,139], ou des inhibiteurs de la cyclooxygénase tel que l'indométhacine sont systématiquement rajoutés à l'échantillon [118,121]. La préparation de l'échantillon se fait aussi sur de la glace pour limiter les réactions oxydatives. La rétention sur une phase stationnaire à polarité de phases inversée C18 est basée sur l'hydrophobicité globale

des eicosanoïdes mais aussi sur d'autres interactions polaires. Pour un bon rendement en eicosanoïdes, nombres de cartouches de SPE sont utilisées avec des performances diverses et dépendant de la complexité de l'échantillon à extraire. En utilisant une cartouche de type C18 Sep-Paks®, avec un échantillon aqueux contenant 15 % de MeOH, un lavage avec 15% MeOH et l'éther de pétrole, et un solvant d'élution à base de formiate de méthyle ou MeOH, Powell a démontré qu'il faut un solvant d'élution contenant au moins 10% d'eau pour augmenter le rendement d'extraction en prostaglandines [131]. Dans cette même étude, un pourcentage élevé de l'ordre de 80% en AA est obtenu avec un solvant d'élution composé au moins de 30% d'eau. Une autre étude conduite avec un solvant d'élution à base d'acétonitrile et d'acétate d'éthyle sur une cartouche Oasis HLB®, a permis d'atteindre des rendements compris entre 72,13 et 99,56 % avec des coefficients de variations de l'ordre de 14% [136]. En utilisant la même cartouche, une autre étude ciblée basée sur 18 eicosanoïdes pour la recherche de biomarqueurs impliqués dans l'athérosclérose a démontré que la SPE était plus performante que la LLE avec des rendements compris entre 61-97% contre 17-54% pour la LLE [39]. Selon cette étude, la LLE s'est avérée très peu efficace pour l'extraction des prostanoïdes avec des rendements de l'ordre de 20%. A l'aide de la cartouche Strata-C18® et le formate de méthyle comme solvant d'élution, Masoodi, *et al.* ont réussi à obtenir des rendements en prostanoïdes et isoprostanes allant de 83 à 116 % [140]. Les protéines de par leur structure sont susceptibles de séquestrer les eicosanoïdes via des interactions ioniques et polaires très fortes, impactant ainsi le rendement d'extraction. De nombreuses études ont recours à certains solvants de précipitation des protéines comme le méthanol [140], l'acétonitrile et l'isopropanol [139] pour déprotéiniser l'échantillon en amont de son extraction. Une acidification de l'échantillon permettrait aussi d'améliorer le rendement d'extraction pour un échantillon solide comme les tissus [140,141]. Somme toute, la SPE est une technique très utilisée de par sa spécificité, sa capacité à concentrer les échantillons permettant de gagner en sensibilité. Il en résulte de meilleurs rendements d'extraction, sa bonne reproductibilité, une réduction considérable en solvant utilisé.

Le **tableau 4** présente un état de l'art non exhaustif sur les méthodes d'extraction des eicosanoïdes développées dans la littérature. Après extraction, les eicosanoïdes sont séparés par chromatographie gazeuse ou liquide avant d'être détecté par spectrométrie de masse [87] et très rarement par un détecteur de fluorescence [121,136,142] ou encore par l'UV pour certaines molécules après dérivatisation avec un agent chromophore [143].

**Tableau 4: Quelques méthodes d'extractions et d'analyse des eicosanoïdes**

<b>Auteur/Référence</b>	<b>Echantillons</b>	<b>Type d'extraction</b>	<b>Cartouche utilisée</b>	<b>Etapes/Solvant</b>	<b>Molécules extraites</b>	<b>LOD</b>	<b>Méthode utilisée</b>
<b>Alon Margalit <i>et al.</i> [124]</b>	Sang périphérique de volontaires et de rat	SPE	Bond Elut C18 Cartridges	<b>Conditionnement</b> : 2 mL MeOH + 2 mL Eau <b>Lavage</b> : 2 mL Eau, 2 mL Ether de pétrole <b>Elution</b> : 1 mL Formate de méthyle	TXB2, PGE2, PGE1, PGF1 $\alpha$ , PGF1 $\alpha$ , PGD2, LTC4, LTB4, 6-Céto PGF1 $\alpha$	0.5-10 pg	GC-MS/MS (HP5988 quadripôle)
<b>Leonardo A. Moraes <i>et al.</i> [142]</b>	Plaquettes sanguines	LLE	—	Acétate d'éthyle - Eau	TXB2, 12-R-HETE, 12-S-HHTrE, AA	1 ng/mL	RP-HPLC- FP-920 fluorescence
<b>Benjamin H. Maskrey <i>et al.</i> [144]</b>	Plaquettes sanguines et Monocytes humaines	LLE	—	<b>Double extraction</b> A.acétique/Isopropanol/hexane (2 :20 :30) suivant un ratio de 2.5ml de solvant pour 1 ml d'échantillon	Phospholipides, HETEs	—	NP-HPLC-UV pour phospholipides, RP-HPLC-MS/MS (QTRAP) pour phospholipides et HETEs et espèces oxydées
<b>Deems <i>et al.</i> [133]</b>	Surnageants cellulaires, liquide spinal de rat	SPE	Strata® X	<b>Conditionnement</b> : 2mL MeOH, 2mL Eau <b>Lavage</b> : 10%MeOH	oxylipines variées	1-50 pg	RP-HPLC-MS/MS (QTRAP)

				<b>Elution</b> : 1 mL MeOH,			
<b>Mojgan Masoodi et al.</b> [145]	Surnageants cellulaires	SPE	Strata C18-E	<b>Conditionnement</b> : 20mL MeOH + 20 mL Eau <b>Lavage</b> : 20mL de 15%MeOH, 20mL Eau et 20 mL hexane <b>Elution</b> : 15mL Formate de methyle	Eicosanoïdes et autres lipides bioactifs	10-30 pg	RPUHPLC- MS/MS (LTQ- Orbitrap® et QTRAP))
<b>Dumlao et al.</b> [107]	Liquide cérébro- spinal	SPE	Strata®-X-3µm	<b>Conditionnement</b> : 3.5 mL MeOH, 3.5 mL Eau <b>Lavage</b> : 3.5 mL 10%MeOH <b>Elution</b> : 1 mL MeOH,	oxylipines variées	0.1-1 pg	RP-HPLC-MS/MS (4000 QTRAP hybrid, triple quadripôle, linear ion trap)
<b>C. Ferreira-Vera et al.</b> [65]	Serum humain	SPE	Hysphere C8 (EC)	<b>Conditionnement</b> : 1 mL MeOH, 2 mL Eau <b>Lavage</b> : 1 mL 10%MeOH <b>Elution</b> : mode isocratique avec eau-Acétonitrile 66:34 (v/v) contenant 0.02% formic acid <b>Equilibration</b> : MeOH, Eau	TXB2, PGE3, PGF2α, PGE2, 15- Céto PGF2α, PGE1, PGD2	2.3-63.3 pg	Online SPE-LC- MS/MS (Agilent 6410 triple quadripôle)
<b>Linda Kortz et al.</b> [82]	Plasma humain	SPE	Strata-X ((20 × 2 mm i.d., 25 µm)	<b>Conditionnement</b> : 10%MeOH contenant A.F <b>Gradient</b> allant de 0 à 90% de 2-propanol - acetonitrile 50:50 v/v)	23 oxylipines dont 14 eicosanoïdes, AGPI	10-1000 pg/mL	On-line SPE-LC- MS/MS (5500 QTrap)
<b>Rago et al.</b> [39]	Plasma humain et de singe	SPE	Oasis HLB® 96 puits	<b>Solvant de chargement</b> : 95% MeOH + 0.1% AF	18 eicosanoïdes (prostanoïdes,	0,25 ng/mL	RPUPLC-MS/MS (QTRAP)

				<p><b>Conditionnement</b> : 300µL éthyle acétate, 300µL MeOH,</p> <p><b>Lavage</b> : solvant de lavage</p> <p><b>Elution</b> : 100µL MeOH, 100µL éthyle acétate</p> <p><b>L'éluion</b> se fait dans une plaque contenant 10µL de 30% Glycérol dans MeOH</p>	LTB4, HETEs, DiHETEs, EETs)		
<b>Karen A. Massey et Anna Nicolaou [146]</b>	Pancréas, tumeur bénigne de l'endomètre	SPE	Strata-C18E (500 mg, 6 ml)	<p><b>Conditionnement</b> : 20mL MeOH + 20 mL Eau Echantillon acidifié (HCl)</p> <p><b>Lavage</b> : 20 mL de 15% MeOH, 20mL eau, 10 mL hexane</p> <p><b>Elution</b> : 12 mL Formate de methylé</p>	PGE2, 12-HETE Autres eicosanoïdes	0.1-20 pg/µL	RP-HPLC-MS/MS et chromatographie chirale-MS/MS
<b>Colas et al. [72]</b>	Rate, nodule lymphatique, serum et plasma humain	SPE	C18 cartridges	<p><b>Conditionnement</b> : 3mL MeOH + 6 mL Eau Echantillon acidifié</p> <p><b>Lavage</b> : 4mL Eau</p> <p><b>Elution</b> : 15mL hexane + 9 mL Formate de methylé</p>	Résolvines, prostanoides, leucotriènes, lipoxines, maresnines	0.22 pg	RP-HPLC-MS/MS (QTRAP 6500)
<b>Jafar Sadik B. Shaik et al. [147]</b>	Cerveau de rat	SPE	Oasis HLB®	<p><b>Conditionnement</b> : 1 mL MeOH, 1 mL Eau</p> <p><b>Lavage</b> : 1 mL 5% MeOH</p> <p><b>Elution</b> : 1 mL MeOH,</p>	11 prostanoides	-	RP-UPLC-MS/MS (TSQ Quantum Ultra triple quadripôle)

				Eluat additionné de 15µL de 0.1%A acétique dans MeOH avant évaporation, resolubilisation ensuite dans 125 µL MeOH-Eau (80 :20)			
<b>Xu Zhang <i>et al.</i> [137]</b>	Plasma Tissus aortique de Souris	SPE LLE	Oasis-HLB pour SPE	<b>SPE</b> <b>Conditionnement</b> : 1 mL MeOH, 1 mL Eau <b>Lavage</b> : 1 mL 5%MeOH Séchage pendant 20 min <b>Elution</b> : 1 mL MeOH, <b>LLE</b> <b>Homogénéisation</b> du tissu avec MeOH acidifié contenant BHT, vortex, centrifugation <b>Extraction</b> du surnageant avec Eau et Acétate Ethyle	Environ 45 Eicosanoïdes	0.2-2 pg	RPUPLC-MS/MS (QTRAP 5500)
<b>Alyne Fávero Galvão <i>et al.</i> [40]</b>	Sang de patient sain et anémié	SPE	Sep-Pak C18 cartridges	<b>Précipitation de protéines</b> par methanol/acetonitrile (1:1, v/v) <b>Conditionnement</b> : 2 mL MeOH, 2 mL Eau acidifiée <b>Lavage</b> : 2 mL eau acidifié <b>Elution</b> : 2 mL MeOH,acidifié	TXB2,PGD2, PGE2, LTB4, Trans LTB4, LTD4, LTE4, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 5-oxo- ETE, 5,6-DiHETE	5 ng/mL pour LOQ	RPUPLC-MS/MS (Xevo TQ-S mass spectrometer)



<b>English et al. [141]</b>	Larmes humaines	SPE	Isolute C18 SPE 500 mg cartridges (Biotage, Charlotte, NC USA),	<b>Conditionnement</b> : 3mL MeOH + 6 mL Eau <b>Lavage</b> : Eau et hexane <b>Elution</b> : Formate de methyle	Résolvines, Lipoxines, 5S,15S- diHETE, PGF2 $\alpha$ , PGE2, PGD2, LTB4,14- HDHA, 17-HDHA, 18- HEPE		
<b>Carlos Artério Sorgi et al. [148]</b>	Poumon Surnageants cellulaires	SPE	Hypersep C18-500 mg, 3mL)	<b>Homogénéisation</b> du tissu dans MeOH/H2O (1:1, v/v) <b>Précipitation</b> dans MeOH/ACN (1:1, v/v) <b>Conditionnement</b> : 4 mL MeOH, 4 mL Eau <b>Lavage</b> : 4 mL Eau <b>Elution</b> : 1 mL MeOH,	Eicosanoïdes	Environ 0.05 pg comme LOQ	RPUHPLC- MS/MS (Triple TOF 5600+ Mass Spectrometer)
<b>Guan-yuan Chen &amp; Qibin Zhang [149]</b>	Plasma humain SRM1950	SPE	HLB Oasis (30 mg) 96 puits	<b>Conditionnement</b> : 1 mL MeOH, 1 mL Eau <b>Lavage</b> : 1.5 mL 5%MeOH <b>Elution</b> : 1.2 mL MeOH,	35 oxylipines + AGPI	0.49-19.53 pg	RPUHPLC- MS/MS (TSQ Quantiva)

### **III. La chromatographie gazeuse pour l'analyse des eicosanoïdes.**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) repose sur l'équilibre de distribution des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. L'hélium, l'azote ou l'hydrogène servent couramment de gaz vecteur. La CPG a pour intérêt d'analyser des composés gazeux ou susceptibles d'être volatilisés par chauffage, sans décomposition. Historiquement la chromatographie en phase gazeuse a joué un rôle central dans l'identification et la quantification des eicosanoïdes dans les échantillons biologiques [150]. Suite à l'indisponibilité d'anticorps spécifiques pour les dosages immuno-enzymatiques et face au défi de couvrir une large gamme d'eicosanoïdes dans une même analyse, l'essor de la chromatographie gazeuse (GC) dans les années 90 a permis d'améliorer les dosages.

L'analyse et la quantification des eicosanoïdes par GC/MS requiert un certain nombre d'étapes: l'ajout systématique d'étalons aux échantillons à doser, l'extraction est suivie de la dérivatisation et la purification des molécules. Pour augmenter la volatilité et assurer la stabilité thermique des molécules lipidiques telles que les acides gras [151] ou de la phosphoethanolamine [152] à analyser, on procède à leur dérivatisation. A partir de l'analyse de lipides de viandes, la méthode de dérivatisation par le triméthylsilyl-diazométhane [151] a été démontrée comme approche alternative pour l'analyse de l'ensemble acides gras des tissus de ruminants. Après dérivatisation des HETEs par méthylation et triméthyl-silylation et transformation des EETs en esters de bromure de pentafluorobenzyle, Shivachar C. Amruthesh et ses collaborateurs ont réussi à démontrer que les métabolites provenant de l'époxygénase notamment le 5,6-EET produit par le cerveau est responsable de la dilatation artérielle [129]. Après dérivatisation de prostanoïdes avec 3 agents (pentafluorobenzyle, méthoxime, triméthylsilyle) et comparaison de leur profil d'intensité, le dérivé du pentafluorobenzyl répondait mieux en SM et a été utilisé pour le suivi des ions de 4 prostanoïdes issu d'un plasma de sang veineux [111]. Les analyses d'eicosanoïdes par GC sont structures-dépendantes. A titre d'exemple, pour l'analyse des cystéinyl-leucotriènes, il faut passer par une réduction catalytique de leur double liaison suivie de la désulfurisation de la fonction thiol ester pour donner le métabolite hydroxylé en position 5 [150]. La GC/MS a permis de discriminer des patients non-fumeurs par rapport aux patients fumeurs via le dosage du 15(S)-8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  avec un ratio de l'ordre de 10 fois sur un échantillon du liquide bronchoalvéolaire après extraction par

chromatographie d'affinité [110,150]. Au travers d'une étude de dosage de prostanoïdes de plasma de 5 volontaires, la GC/MS/MS a permis de quantifier 4 métabolites (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , 6-Céto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$  et TXB<sub>2</sub>) avec des concentrations allant de 2 à 45 pg/mL [111].

Les multiples étapes de prétraitement d'échantillons impliquent non seulement des méthodes très longues mais aussi très peu répétables et reproductibles. La disponibilité d'agent de dérivatisation et l'impossibilité de l'appliquer directement pour certains eicosanoïdes comme les cystéinyl-leucotriènes affectent de nos jours la fiabilité de cette méthode de séparation. Enfin les multiples fonctions labiles des eicosanoïdes sont autant de facteurs qui font que de nos jours, l'on a plutôt recours à la chromatographie liquide pour leur analyse.

## **IV. La chromatographie liquide pour l'analyse des eicosanoïdes**

La ressemblance structurale des eicosanoïdes complique leur séparation en chromatographie liquide. Le long squelette carboné des eicosanoïdes, ainsi que leurs insaturations et fonctions (hydroxyles, cétones, carboxyliques) impliquent des interactions diverses avec la phase stationnaire et la phase mobile pour aider à leur séparation. Parmi ces interactions, on peut citer entre autres : les interactions hydrophobes, les interactions polaires de type liaisons hydrogènes et d'échanges d'ions. Cette dernière même si elle existe semble moins importante pour aider à la séparation des eicosanoïdes. En effet, l'état protoné ou non des eicosanoïdes joue peu dans leur séparation à l'exception des cystéinyl-eicosanoïdes dont l'ionisation varie considérablement en fonction du pH de la phase mobile. Au vu de la complexité et ressemblance structurale des eicosanoïdes, nous nous sommes penchés sur l'exploration de la chromatographie liquide à polarité de phases normale et à polarité de phases inversée pour tenter de résoudre les difficultés de séparation des isobares et isomères d'eicosanoïdes.

### **1. La chromatographie liquide à polarité de phases normale**

La chromatographie liquide à polarité de phases normale est une technique de chromatographie dans laquelle la phase stationnaire est de nature polaire et la phase mobile apolaire. La chromatographie liquide haute performance à polarité de phases normale (NP-HPLC) présente quelques avantages non négligeables à savoir une faible viscosité des solvants permettant de

travailler à des pressions relativement faibles et des solvants faciles à évaporer. Couramment utilisée pour la séparation en classes des lipides de diverses origines [153], la NP-HPLC a permis de réduire les effets de suppression d'ion et d'améliorer la sensibilité d'une méthode bidimensionnelle en ligne NP-RP-HPLC-QTOF [154]. Les données d'analyse des eicosanoïdes par NP-HPLC dans la littérature sont très rares. La NP-HPLC a été utilisée dans d'autres études pour purifier l'extrait obtenu après extraction et dérivatisation des eicosanoïdes pour analyse en GC-MS/MS [111]. Pour évaluer l'implication de certains isomères de EET dans la physiopathologie des artères [129], cette technique a permis d'améliorer la purification du 5,6-EET sur une cartouche de silice  $\mu$ Porasil Radial-Pak A (10 cm x 8 mm, 4 $\mu$ m). A ce jour, il n'existe qu'une seule méthode de séparation en NP-HPLC des eicosanoïdes qui non seulement est très longue (2h au total) mais restreinte à quelques eicosanoïdes [143]. A partir d'une phase mobile à base d'hexane et d'isopropanol, une colonne de silice Rosil (300 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m), Powell a réussi à séparer deux isomères trans du LTB<sub>4</sub> vis à vis du LTB<sub>4</sub> mais aussi d'autres espèces monohydroxylés [143]. En revanche, la largeur des pics de la TXB<sub>2</sub>, du 6-céto PGF<sub>1</sub> $\alpha$  mal résolus vis-à-vis de la PGE<sub>2</sub>, ainsi que la qualité du chromatogramme affecterait la précision et la répétabilité des analyses. Afin d'améliorer davantage cette séparation, la chromatographie liquide à polarité de phases inversée (RP-HPLC) couplée en amont du SM est la méthode par excellence pour le dosage des eicosanoïdes.

## **2. La chromatographie liquide à polarité de phases inversée**

La littérature rapporte que les eicosanoïdes sont de nos jours séparés en chromatographie liquide à polarité de phases inversée principalement sur une phase stationnaire greffée C18 [87,141]. La chromatographie liquide à polarité de phases inversée est basée sur une phase mobile polaire et une phase stationnaire qui se distingue par son caractère apolaire. 60 à 80% des séparations d'analytes sont réalisées par chromatographie à polarité de phases inversée [155]. Les composés ionisés sont moins retenus dans ce type de chromatographie, d'où l'usage d'un acide pour baisser le pH et ainsi maintenir les composés ionisables dans leur état non ionisé. Une maîtrise des différents paramètres et acteurs qui entrent en jeu sont nécessaires au cours du développement d'une méthode chromatographique. Parmi ces paramètres, on distingue entre autres le choix de la phase stationnaire, la composition de la phase mobile, les interactions soluté-phase stationnaire et phase mobile, le pH de la phase mobile, la température.

Le choix de la phase stationnaire est un préalable à tout développement de méthode de séparation en chromatographie liquide. Même si le développement de phases stationnaires a connu un grand essor pour s'adapter aux difficultés de séparations de molécules diverses et aux conditions d'analyses, un problème demeure : choisir la colonne adéquate à la séparation des analytes d'intérêts. En RP-HPLC, la phase stationnaire est représentée la plupart du temps, par des silices greffées avec des chaînes carbonées de différentes longueurs, le plus souvent de 8 ou 18 carbones [65], mais pouvant aller de 1 carbone [156] à 34 carbones [157]. Le choix d'une colonne adaptée à la séparation de métabolites passe dans un premier temps par une compréhension des caractéristiques physico-chimiques de ces phases stationnaires tels que la nature du silanols, les greffages et les dimensions des particules de ces phases.

## **2.1. Nature-chimie des silanols**

La silice utilisée en chromatographie est une silice amorphe et poreuse. Il est particulièrement important de connaître et comprendre la structure/la chimie des silanols car d'eux dépendra notamment des interactions spécifiques avec le soluté et aussi des possibilités de greffage pour améliorer la sélectivité de séparation. Afin de choisir une phase stationnaire équivalente en RP-HPLC, Borges a montré que les interactions d'échange d'ions et de liaisons hydrogènes entre les silanols libres des phases stationnaires et les solutés sont à la base de différences de performances en termes de sélectivités de phases stationnaires C18 de même caractéristiques [158]. Suivant plusieurs travaux, la contamination aux métaux semble être la principale source d'activation des silanols, de l'hétérogénéité de réactivité des silanols ainsi que la variabilité dans les procédures de greffage avec des chaînes [159–161]. En effet, plus il y aura de métaux dans la silice de base, et plus on aura des groupements silanols très acide. Avant les années 2000, l'une des approches pour réduire cette activation est de réduire le contact avec les métaux au cours de procédures de synthèses [161]. Cependant, pour se débarrasser des métaux, il faut utiliser des pièces métalliques dépourvues de métaux, chose qui est impossible. La teneur en métaux dépend donc du procédé de fabrication. A ce jour, on distingue deux types de silice : une silice de type A (silice traditionnel contenant une grande teneur en impuretés métalliques) et une silice de type B (silice ultrapure qui est récente, contenant une très faible teneur en impuretés métalliques) [160]. L'asymétrie de pics de composés basiques et la perte en efficacité observées au cours d'analyse de composés basiques sur des phases stationnaires à polarité de phases inversée synthétisées avec des silices de types A s'expliquent par une forte acidité de ces dernières [161–163]. De plus, l'hétérogénéité de distribution des silanols des silices de type

A serait à l'origine de sites d'énergies hétérogènes. Une désactivation de la silice de base avant greffage est effectué par plusieurs fabricants par lavage à l'acide minéral [161]. De nos jours, des silices ultrapure de type B contenant de très faible teneur en métaux sont obtenus par polymérisation avec un organosilane tel que le tétraéthoxysilane [161,164]. D'autres études ont montré une réduction de l'acidité des silices par endcapping [161,164,165] ou par des groupements polaires intégrés dans les chaînes [166]. Malgré cette dernière procédure de synthèse, plus de 50% des silanols ne peuvent être greffés avec de petits groupements à chaîne courte du fait de la résistance stérique opposés par les chaînes alkyles de type C18 par exemple.

Les groupements OH présents sur les silanols ont des caractéristiques physico-chimiques différentes en fonction du pH du milieu dans lequel ils se trouvent. En milieu aqueux à pH acide, l'oxyde de silicium est protoné pour donner du  $\text{Si-OH}_2^+$ . Cette molécule va donc pouvoir entraîner des phénomènes d'échange d'anions au cours d'une analyse en chromatographie liquide. En revanche dans des conditions basiques ( $\text{pH} > \text{pI}$ ), le silanol perd un proton et devient du  $\text{Si-O}^-$  et donc susceptible d'induire des phénomènes d'échanges de cations. Les mécanismes impliqués dans ce type de chromatographie sont ceux d'échanges d'ions. La conséquence de ces interactions c'est qu'il y a une traînée de pic chromatographique qui nuit à la qualité de l'analyse. Donc pour l'analyse de composés possédant des groupements COOH comme les eicosanoïdes, il est souhaitable donc de baisser le pH de la phase mobile afin de réduire ou d'empêcher ces interactions silanol-analyte. A ce titre, l'acide acétique et l'acide formique sont les plus utilisés pour l'analyse des eicosanoïdes [39,40,54,65,82,107,118,119,147]. Aussi, la silice offre des possibilités de greffage de type alkyle pour obtenir un caractère hydrophobe de la phase stationnaire exploitable en chromatographie liquide à polarité de phases inversée.

## 2.2. Les différents types de greffage

Quatre types de greffage peuvent être envisagés : Si-O-C, Si-C, Si-N, et Si-O-Si. Pour des raisons de stabilité (hydrolyse en milieu aqueux ou hydroorganique), seul celui reposant sur la création de pont siloxane s'avère utilisable via le départ du chlore issu du réactif de greffage [159,167]. Nous nous limiterons dans le cadre du développement de la première partie de notre méthode (**Partie II-Chapitre 1**) à présenter des stratégies de greffage des phases stationnaires dédiées à l'analyse en RP-HPLC. La **figure 12** représente le principe de base pour le greffage d'une chaîne alkyle sur un silanol.



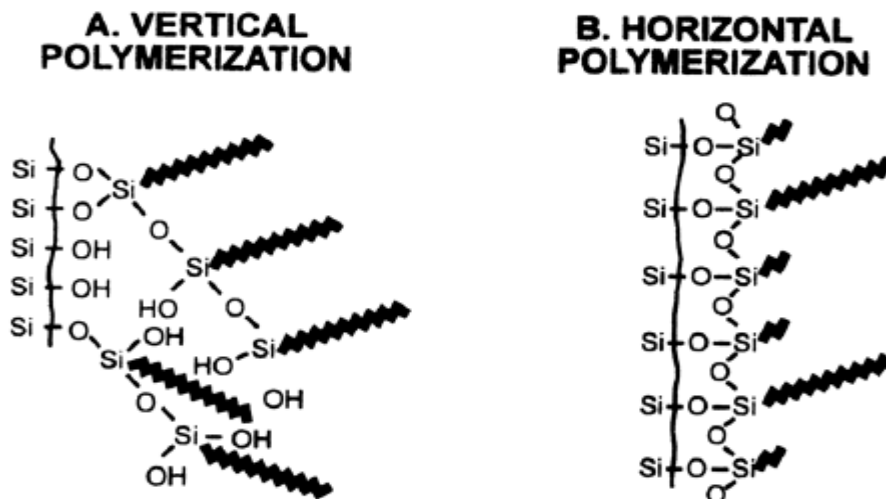
**Figure 12: Réaction de greffage sur un silanol**

R = groupement alkyle, X = groupement partant

L'appellation monofonctionnel, difonctionnel ou trifonctionnel du silane fait référence respectivement à la présence d'un, de deux, ou de trois groupes partants. Ceci donne lieu à plusieurs possibilités de greffages pour arriver ainsi à augmenter le pourcentage de carbone dans la phase stationnaire, un des critères clés dans le choix d'une phase stationnaire. En effet une grande teneur en carbone est considérée comme prédictive d'une rétention élevée.

La présence ou absence d'eau permet dans les conditions opératoires d'avoir différents types de greffages à savoir : un greffage monomérique, un greffage polymérique (**Fig.13**) et un greffage oligomérique. En absence de toute trace d'eau, l'emploi de greffons mono-, di- ou trifonctionnel aboutit à un greffage de type monomérique. Il existe deux techniques pour obtenir une greffage polymérique : une polymérisation verticale et une polymérisation horizontale (**Fig.13**) [168].

- Suivant la polymérisation verticale qui s'effectue en solution, il peut soit se former un pont siloxane entre le greffon et le silanol, soit le greffon réagit avec l'eau, générant un groupement silanol à la place d'un groupement partant sur le greffon. Le silanol qui en résulte peut être impliqué dans une réaction avec un autre greffon, aboutissant ainsi à une polymérisation verticale orientée. Il en résulte une phase stationnaire de type multicouche à l'origine de mécanismes de rétention plus complexes que ceux sur une silice greffée monomérique. Une reconnaissance de forme plus importante des phases polymériques provenant de la rigidité des greffons par rapport aux phases monomériques a été rapportée dans les travaux de Sander et Wise sur la séparation de molécules aromatiques polycycliques [169]. Nous reviendrons sur ce facteur de reconnaissance stérique dans le chapitre 1 de la partie II de ce travail de thèse.
- La polymérisation horizontale repose sur une polymérisation contrôlée s'opérant uniquement en surface de la silice préalablement hydratée par de l'eau [170].



**Figure 13: Schémas d'un greffage par A) polymérisation verticale et par B) polymérisation horizontale [168].**

Les phases stationnaires polymériques sont plus difficiles à produire de manière uniforme. Des problèmes de reproductibilité aboutissant à une rétention et une sélectivité variable par rapport aux phases monofonctionnelles sont décrits dans la littérature [168]. Dans cette thèse, nous n'aborderons que les phases de type monomériques pour la séparation en RP-HPLC.

Les chaînes octadécyles sont les plus utilisées pour la séparation de composés tant dans le domaine pharmaceutique qu'en métabolomique. Les greffages à chaînes courtes sont utilisées pour la séparation des protéines tandis que ceux plus longs c'est-à-dire plus de 18 carbones sont dédiés pour des composés de types caroténoïdes [157], les eicosanoïdes [39,65,72,82,87], différentes classes lipidiques [171] et autres composés qui nécessitent une reconnaissance de forme plus importante. A tout cela, il faut ajouter qu'il existe également des phases greffées avec des groupements phényles, fluorés (qui permet une sélectivité particulière vis-à-vis des composés halogénés), ou cyano, ou l'adjonction de groupement polaire [168] sur la chaîne octadécyle. L'asymétrie des pics de composés basiques analysés à pH acide a poussé au développement de phases avec groupements polaires intégrés (GPI) [168,172,173]. Une variété de GPI tels que les amides, les carbamates, sulfamides et urées peuvent être soit incorporés entre la chaîne alkyle à greffer et le silanol, soit servir pour le endcapping. Ces phases stationnaires présentent souvent des pics symétriques et une meilleure efficacité pour les composés polaires, notamment pour les solutés ionisables. Un autre avantage de la plupart des



colonnes avec des phases stationnaires de groupe polaire incorporées est qu'ils peuvent être utilisés avec des phases mobiles hautement aqueuses.

### **2.3. D'une phase stationnaire HPLC vers une phase de type UHPLC**

Les différentes stratégies de polymérisation ont permis d'augmenter le pourcentage de greffage, de couvrir les silanols via des ponts siloxane et donc d'obtenir des phases stationnaires plus hydrophobes. La chimie du silanol a beaucoup évolué et a permis de concevoir des phases stationnaires améliorées par plusieurs stratégies :

-End-capping [174]: il s'agit d'un greffage supplémentaire par un organosilane d'encombrement réduit – typiquement un C1, qui pourra réagir avec les groupements silanol peu accessibles à des greffons à chaîne plus longue pour des raisons stériques. Les organosilanes les plus utilisés sont : (triméthylchlorosilane (TMCS) ou d'hexaméthylidisilazane (HMDS)) [175]. Ces groupements organosilanes ont pour but d'empêcher l'accès des analytes aux silanols afin d'améliorer l'efficacité des pics par réduction des interactions secondaires.

Pour obtenir un nombre maximal de plateaux théoriques  $N$  dans une colonne, il convient de définir les conditions optimales où la hauteur de plateau réduite  $h$  est minimale. L'étude des différents mécanismes d'élargissement d'une bande de soluté au cours de sa progression au sein d'une colonne chromatographique et l'influence de chacun de ces facteurs permet de mieux définir la hauteur réduite nécessaire pour obtenir une séparation optimale. L'étalement d'une bande d'élution suivant les différents modèles développés à ce jour, semblent provenir de trois origines : la dispersion des molécules par diffusion longitudinale, l'existence de « chemins multiples » dus au remplissage (anisotropie d'écoulement) et la résistance au transfert de masse dans chacune des deux phases. Parmi les nombreuses théories et modèles issus de la théorie dynamique de la chromatographie [176], pour définir les mécanismes et caractéristiques qui contribuent à expliquer l'élargissement des bandes d'élution de pics liés à différents facteurs physico-chimiques, la plus utilisée dans la littérature est celle de Van Deemter. L'équation de Van Deemter [177] issue d'un modèle de la mécanique des fluides a été mis au point par J.J. Van Deemter (physicien) en 1956. Cette équation provient de la théorie de cinétique macroscopique qui permet de décrire les différents processus de déséquilibre qui conduisent à l'élargissement de la bande d'élution des molécules. Il s'agit d'une équation qui relie l'efficacité d'une colonne caractérisée par sa hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile. En prenant en compte les

phénomènes de convection et de dispersion [177], la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) d'une colonne peut être définie comme suit :

$$HEPT = \frac{2D_L}{u} + \frac{2u}{k'_m F} \left( \frac{k}{1+k} \right)^2 \quad \text{Equation 1}$$

Avec

$$k = \alpha F$$

$$F = \frac{(1-\epsilon)}{\epsilon} : \text{le ratio de phase et } \epsilon \text{ correspond à la porosité totale}$$

$D_L$  : Coefficient de dispersion axial

$u$  : Vitesse linéaire de la phase mobile

$k'_m$  : Coefficient apparent de transfert de masse

$k$  : facteur de rétention

Van Deemter *et al* [177] ont démontré que le coefficient de diffusion axial ( $D_L$ ) peut être calculé par la somme de la diffusivité moléculaire et la dispersion turbulente.

$$D_L = \gamma D_m + \lambda D_p u \quad \text{Equation 2}$$

En combinant l'équation 1 et 2, on peut déduire l'équation globale de la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) :

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + Cu \quad \text{Equation 3}$$

Avec

$$A = 2\lambda D_p \quad ; \quad B = 2\gamma D_m \quad ; \quad C = \frac{2}{k'_m F} \left( \frac{k}{1+k} \right)^2$$

A : Diffusion turbulente en lien avec l'homogénéité de remplissage des phases stationnaires.

B : Diffusion longitudinale en lien avec la dispersion du soluté à cause de la diffusion différenciée du soluté dans la colonne dépendant de la vitesse linéaire de la phase mobile.

C : Résistance au transfert de masse en lien avec la taille des pores, la viscosité et le coefficient de diffusion dans la phase mobile. Ce terme est dû par exemple au fait que certaines molécules ont des difficultés d'accès aux pores quand leur taille est trop importante par rapport à ceux-ci, ce qui ralentit les échanges du soluté entre les phases mobiles et stationnaires.

-Modification de la structure de la particule sur laquelle est greffée la chaîne carbonée. En effet, de nouveaux supports chromatographiques ont été commercialisés utilisant des particules de silice superficiellement poreuses [178–180]. Ces supports ont été développés par Horváth puis par Kirkland [168]. Il s'agit de colonnes remplies avec des particules « core shell sub-2  $\mu\text{m}$  » de moins de 2 $\mu\text{m}$  de diamètre. Il faut préciser que l'idée de diminuer la taille des particules pour travailler à haute pression a été proposée pour la première fois dans les années 1970 par Giddings, qui a montré qu'on améliore l'impédance de séparation en diminuant la taille de particules [181]. Des temps d'analyse plus courts, notamment en liaison avec l'utilisation de colonnes de diamètre interne réduit, permettent de réaliser des économies considérables sur le coût des solvants de la phase mobile et de leur élimination [178,182]. Les équipements UHPLC, notamment les colonnes induisent non seulement une haute pression et faible volume mort permettant d'obtenir de bonnes performances analytiques mais aussi génèrent des problèmes de chauffage par friction et des modifications de la rétention des composés à séparer. Ces dernières années, les particules partiellement poreuses « core-shell » ou simplement « shell » sont devenues de plus en plus populaires [178] et accompagnent ainsi les progrès en matière de méthodes de préparation, de performances et de comparaison avec les colonnes de particules totalement poreuses. Les particules superficiellement poreuses ont la particularité d'offrir une rapidité d'analyse tout en maintenant l'efficacité de la séparation, ce qui est d'une importance capitale lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être analysé. En effet, une particule superficiellement poreuse «core shell» peut être définie comme une couche poreuse entourant une particule non poreuse «core», ce qui limite la pénétration du soluté [178]. Ces supports sont constitués d'un cœur (core) non poreux sur lequel vient se fixer une enveloppe (shell) de silice poreuse. Ces colonnes ont une efficacité proche des colonnes sub-2  $\mu\text{m}$  avec une perte de charge beaucoup plus faible [178,183]. Gritti et Guiochon ont démontré que la bonne performance des colonnes en core shell résulte d'un terme B plus petit (en raison de la non porosité du noyau, ce qui donne un volume de lit compact et une réduction de l'accessibilité à la diffusion) et d'un terme A très réduit (compte tenu de l'homogénéité de remplissage mais aussi de la forme régulière des particules core shell préalablement constituées) [180,184,185]. La grande

contribution de la diffusion turbulente (terme A) de l'équation de Van Deemter provient des effets de couches de bordures trans-colonnes et/ ou des parois de la colonne [178,183]. Entre une colonne de diamètre 4,6 mm et 2,1 mm, celle de 2,1 mm sera plus efficace puisque la diffusion du soluté est beaucoup plus réduite du centre vers la paroi (la distance du centre à la bordure étant manifestement plus grande pour une colonne de 4,6 mm) [178]. Guiochon, *et al.* [184,186] ont aussi fait le lien entre une étroite distribution de la taille des particules et une augmentation de l'efficacité. La distribution de la taille des pores est beaucoup plus réduite pour les core shell contrairement aux particules totalement poreuses. L'augmentation de la taille des pores des particules de 80 à 120 Å conduit à une amélioration de l'efficacité des colonnes dans le cadre de l'analyse des peptides et de petites protéines [187,188]. L'on peut donc déduire que plus la taille des pores est adéquate pour la molécule à analyser, plus on gagne en efficacité de séparation. Une extrapolation réfléchie en comparant les peptides aux eicosanoïdes en termes de taille nous emmènerait à prédire l'utilisation de colonnes dont la taille des pores n'excède pas 120 Å. Pour de grosses molécules comme les protéines, une particule de diamètre des pores beaucoup plus grand est requise. La finesse de l'épaisseur du shell (couche qui entoure le core) et aussi le diamètre des pores influencent fortement l'efficacité des colonnes dans la séparation de petites molécules comme grandes [178]. Des travaux de Langsi, *et al.* [189], il en ressort que la hauteur réduite minimale d'un plateau théorique pour une colonne conditionnée avec des particules de diamètre 1,5 ; 1,7 et 1,9 recouvert par avec une fine épaisseur de shell de 50 nm est de l'ordre de 4, alors qu'elle est largement supérieure lorsqu'on utilise une colonne de 1,7 mm recouvert par un shell de 150 nm.

En ce qui concerne les mécanismes qui expliquent la rétention sur une phase stationnaire à polarité de phases inversée, deux théories sont proposées : la théorie solvophobe de Horwath en 1976 [155] et celle des réseaux de Dill en 1987 [190,191].

La théorie solvophobe décrit la rétention comme un processus d'association réversible entre un ligand hydrocarboné (phase stationnaire) et la molécule de soluté. Plus la surface de contact sera importante entre la phase stationnaire et le soluté et plus la rétention sera importante. En réalité, les interactions hydrophobes entre le soluté et la phase stationnaire suivant cette théorie, proviennent d'une répulsion nette entre la phase mobile et le ligand apolaire (phase stationnaire) ainsi que le fragment apolaire du soluté. La tendance de l'eau à réduire la surface non polaire des molécules en contact avec le solvant est alors principalement responsable de leur association. Autrement dit, c'est principalement le solvant qui force (repousse) les solutés à

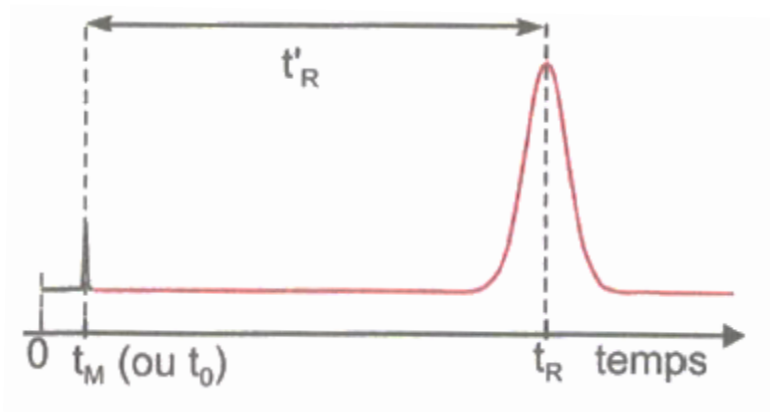
s'amarrer (s'associer) plutôt que l'attraction qui les lie. La phase stationnaire n'a donc qu'un rôle passif dans ce mécanisme de la rétention [155]. En revanche, la théorie des réseaux [191] stipule que la phase stationnaire joue un rôle actif dans le mécanisme de la rétention. Le transfert de soluté d'une phase à l'autre est sous contrôle de la phase stationnaire. Le mécanisme de rétention est basé sur la différence d'affinité chimique du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile. Ceci fait donc appel à des mécanismes de partage ou d'absorption entre les deux phases.

Suivant les deux théories, pour éluer le soluté, il faudrait que la force éluante soit suffisante pour solubiliser le soluté. De ce fait, la rétention est corrélée à l'énergie nécessaire pour créer une sorte de cavité pour permettre l'insertion du soluté au sein de la phase mobile. Cette énergie dépend à la fois des paramètres physico-chimiques de la phase mobile (sa tension de surface et sa constance diélectrique) et de la taille du soluté [155,190,192]. Les interactions entre le soluté et la phase mobile sont spécifiques et vont jouer un rôle majeur dans la rétention et la sélectivité de la séparation. Mis à part la sélectivité, il existe d'autres descripteurs de performance chromatographiques que nous allons aborder dans le paragraphe 2.4 et 2.5 qui suivent.

## **2.4. Les critères de descriptions des performances chromatographiques des phases stationnaires**

### **2.4.1. Les paramètres caractérisant la rétention**

Comme le montre le chromatogramme ci-dessous, un analyte d'intérêt est caractérisé par son temps de rétention  $t_R$  (qui correspond au temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié). En pratique, on définit un temps de rétention réduit qui correspond à la différence entre le temps de rétention et le temps mort ( $t_m$  : qui est le temps que met la phase mobile pour traverser la colonne).



**Figure 14: Chromatogramme type d'un soluté quelconque [193]**

Le facteur de rétention ou encore facteur de capacité défini par  $k$  est un paramètre très important de la chromatographie et rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé.

$$k = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad \text{Equation 4}$$

Il est courant de définir dans certains cas le temps de rétention réduit  $t_{R'}$  par la relation :

$$t_{R'} = t_R - t_m \quad \text{Equation 5}$$

En effet, le temps de rétention dépend de trois facteurs [194] : le facteur de rétention du soluté, les dimensions de la colonne, le débit de la phase mobile. Seul le facteur de rétention est influencé par les processus physico-chimiques qui ont lieu au cours de la séparation. Ce sont ces différents processus notamment les types d'interactions entre les trois acteurs (phase stationnaire, soluté, phase mobile) au cours du processus chromatographique qui définissent donc la sélectivité de la séparation.

#### **2.4.2. Les paramètres liés à l'efficacité d'une colonne chromatographique**

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques  $N$  de la colonne [195]. La théorie des plateaux est née de la recherche d'un modèle statistique permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique. Il s'agit d'une progression par transfert successif de la phase mobile qui finit par se mettre en équilibre avec la phase stationnaire entre deux transferts, ce qui permet de découper la colonne de manière abstraite en un certain nombre

de zones où les équilibres sont réalisés et que l'on appelle plateaux théoriques. On appelle donc plateau théorique la portion de phase stationnaire dans laquelle un soluté est en équilibre de répartition entre les phases mobile et stationnaire.

La théorie des plateaux stipule que les pics d'éluion de composé peuvent être assimilés à des courbes de Gauss, dont l'écart type est lié au nombre de plateaux théoriques parcourus par la relation [194,195]:

$$\sigma^2 = \frac{t_R^2}{N} \quad \text{Equation 6}$$

La largeur du pic  $\omega$  à une ordonnée déterminée est reliée au carré de l'écart-type ou variance  $\sigma^2$  par l'équation :

$$\omega^2 = a\sigma^2 \quad \text{Equation 7}$$

Des **équations 4 et 5**, on peut déduire l'efficacité de la colonne N.

$$N = a\left(\frac{t_R}{\omega}\right)^2 \quad \text{Equation 8}$$

La constante « a » varie en fonction des différentes méthodes de calculs suivant la hauteur à laquelle a été mesurée cette largeur comme indiqué dans le **tableau 5** [195].

**Tableau 5: Récapitulatif des différentes largeurs d'un pic gaussien pour le calcul de l'efficacité d'une colonne chromatographique**

$\omega$	a	Méthode
$\omega_i$	4	Points d'inflexion
$\omega_h$	5,54	Largeur à mi-hauteur $\delta$
$\omega_{3\sigma}$	9	$3\sigma$
$\omega_{4\sigma}$	16	$4\sigma$
$\omega_{5\sigma}$	25	$5\sigma$
$\omega_{\tan}$	16	Des tangentes

Les méthodes les plus utilisées pour le calcul de N sont celles de la largeur à mi-hauteur et celles de  $4\sigma$  (Largeur mesurée à 13,4% de la base du pic.). Le logiciel d'intégration des données chromatographiques (Chromeleon™) utilisé dans le cadre de cette étude utilise la méthode de

largeur mesurée à mi-hauteur. Ceci donc permet de déduire l'équation suivante à partir de l'équation 8 :

$$N = 5,54\left(\frac{t_R}{\delta}\right)^2$$

Equation 9

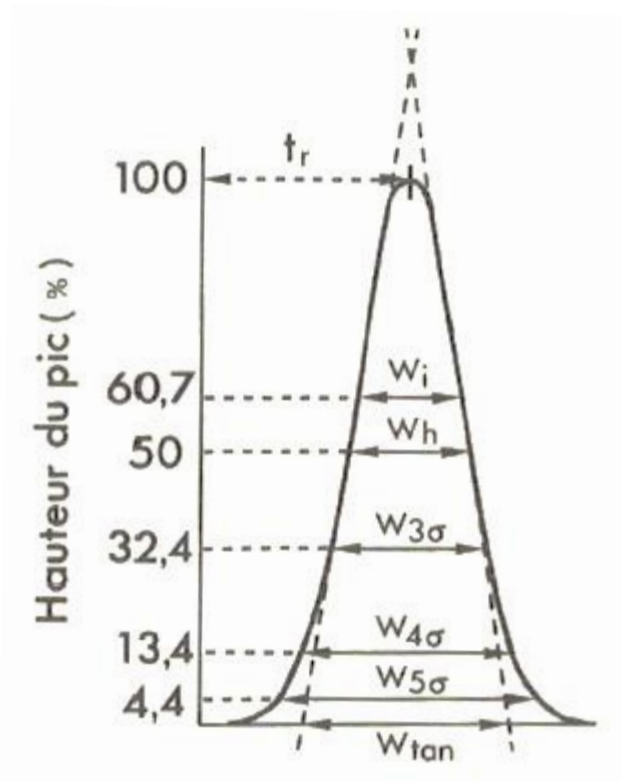


Figure 15: Pic gaussien avec les différentes méthodes d'intégration pour le calcul de l'efficacité [195]

Pour exprimer l'efficacité d'une colonne de longueur L et de N plateaux théoriques, on définit la hauteur H équivalent à un plateau théorique HEPT suivant l'équation ci-dessous :

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N}$$

Equation 10

On sait en théorie que la HEPT d'une colonne efficace est globalement égale à 2-3 fois le diamètre des particules. Dans la théorie des plateaux, la HEPT déduite de la variance du pic d'éluion [195] n'apparaît que comme une mesure globale de l'influence de tous les paramètres mis en jeu, mais elle ne permet pas de préciser la part revenant à chaque paramètre (diamètre et nature des particules de la phase stationnaire, nature et vitesse de la force éluante, nature du



soluté, homogénéité de remplissage de la colonne) dans l'étalement du pic au fur et mesure de sa progression dans la colonne.

Afin de préciser la contribution de chaque paramètre à la HEPT globale, et de permettre une optimisation aisée des conditions d'analyse, il est courant de calculer des grandeurs réduites (adimensionnelles) telle que la hauteur à un plateau théorique réduit  $h$ . C'est une grandeur fondamentale permettant de comparer plusieurs systèmes chromatographiques en faisant abstraction de la géométrie de colonne et du remplissage. Elle représente le nombre de couches de particules par plateau théorique. Le facteur  $h$  permet de comparer entre elles les efficacités intrinsèques de colonnes remplies avec des particules de taille différente. A titre d'exemple, une colonne intrinsèquement efficace utilisée au voisinage des conditions optimales a une hauteur de plateau réduite comprise entre 2 et 4. Le  $h$  est en quelque sorte la constante 2 à 3 fois définie comme le coefficient qui multiplie le diamètre des particules pour retrouver la HEPT.

$$h = \frac{HEPT}{d_p} \quad \text{Equation 11}$$

avec  $d_p$  : diamètre des particules

### 2.4.3. Les paramètres liés à la séparation

#### 2.4.3.1. Le facteur de séparation ou sélectivité entre deux pics

La sélectivité ( $\alpha$ ) est définie comme étant le rapport des facteurs de rétentions entre deux pics consécutifs. Elle fait partie des critères qui rendent compte de la qualité de séparation.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2'}}{t_{R1'}} \quad \text{Equation 12}$$

Au début des années 1990, la rétention en RP-HPLC [196] a été attribuée aux interactions solvophobique dans lesquelles l'ampleur de la rétention du soluté en chromatographie liquide est déterminée par l'équilibre énergétique de l'éluant-phase stationnaire et de l'interaction soluté-éluant [155]. La solvatisation du soluté explique uniquement la rétention relative. Différents modèles illustratifs des interactions soluté-phase stationnaire s'ajoutent aux interactions dans le modèle solvophobe pour expliquer la sélectivité différentielle entre plusieurs composés ionisés ou non. Plusieurs systèmes de sélection de colonnes sont décrits

dans la littérature et constituent des bases de raisonnement dans le choix de colonnes adaptées à des séparations de solutés pour diverses applications.

### **2.4.3.2. Système de sélection de colonnes**

Le mécanisme de rétention en RP-HPLC repose sur plusieurs facteurs et est fortement lié à des phénomènes moléculaires entre la phase stationnaire, la phase mobile et les solutés. En réalité, la structure des molécules implique des interactions particulières qui doivent être considérées avant de choisir la phase stationnaire appropriée. À ce jour, la base de données « Column Selectivity Database » [197] rapporte environ 751 colonnes RP-HPLC avec de différentes sélectivités. La plupart d'entre eux diffèrent très peu en termes de sélectivité, mais cette différence est souvent suffisante pour obtenir la séparation requise [198]. La colonne susceptible d'être sélectionnée dépend donc de la structure des molécules. Pendant des années, plusieurs approches ont été proposées dans la littérature pour classer et discriminer les colonnes en fonction de leurs performances chromatographiques [198,199].

Plusieurs systèmes de sélection de colonnes (CSS) ont été développés et ont guidé les chromatographes en séparation de molécules environnementales, biologiques, pharmaceutiques, etc. La plupart d'entre eux évaluent les performances des phases stationnaires à travers un rapport entre le facteur de rétention d'une molécule donnée et une molécule de référence qui représente l'interaction se produisant lors du processus chromatographique. Sur la base du rapport du facteur  $k$  entre les analytes polaires ou basiques et les composés de référence, le système de sélection de colonne d'Engelhardt a fourni des informations intéressantes sur l'accessibilité du silanol [198]. S'inspirant d'Engelhardt, Tanaka, *et al.* [200] ont développé un autre système qui met en évidence des interactions supplémentaires telles que la sélectivité liée aux liaisons hydrogène et la sélectivité de forme. Pour sélectionner une colonne appropriée avec groupement polaires intégrés (GPI) pour les solutés acides ou basiques, le modèle de Layne *et al.* [201] semble approprié. De 26 à 8 composés de référence, Euerby a modifié le système suivant Tanaka et a défini le facteur de différence de colonne (CDF) comme la distance euclidienne entre une colonne donnée et une colonne de référence choisie a priori [198]. Le modèle précédent n'a pas fait l'objet d'étude dans notre travail car il est difficile de prédire quelle phase stationnaire peut être choisie comme colonne de référence pour la séparation des isomères et des isobares des eicosanoïdes. En effet, la taille, la polarité, la rigidité, la planéité

et le degré d'insaturation dus à la structure des eicosanoïdes rendent difficile le choix d'une colonne de référence.

En 1970, une approche quantitative pertinente pour la prédiction de la rétention chromatographique à partir de la structure moléculaire est apparue et était connue sous le nom de relation quantitative structure-rétention (QSRR). Dérivé de la théorie solvophile, le modèle LFER (Linear Free Energy relationships) est un modèle QSRR introduit par Abraham et qui a permis de prédire les facteurs de rétention chromatographiques pour des phases stationnaires [198]. Même si force est de constater que les systèmes de sélection de colonnes sont soit incomplets, soit développés pour compléter un autre système de sélection, le HSM est un modèle faisant consensus dans la communauté scientifique, comme en témoigne de nombreux travaux d'applications pharmaceutiques [202,203], de compréhension de la dégradation de phases stationnaires [198], de recherche sur l'amélioration de la sélectivité de phases stationnaires [203] et de sélections de phases stationnaires de sélectivité similaire [204]. Nous allons détailler dans le paragraphe qui suit les modèles QSRR car il s'agit de modèles qui prennent en compte le plus d'interactions moléculaires ayant lieu au cours du processus chromatographique.

#### 2.4.3.2.1. Le modèle de solvation dans la rétention en RP-HPLC [205]

Ce modèle est défini par l'équation suivante :

$$\mathbf{logk} = \mathbf{C}_1 + \mathbf{rR}_2 + \mathbf{s}\pi_2^H + \mathbf{a} \sum \alpha_2^H + \mathbf{b} \sum \beta_2 + \mathbf{v}V_x \quad \text{Equation 13}$$

i
ii
iii
iv
v
vi

$C_1$  est une constante indépendante du soluté,

$r, s, a, b$  et  $v$  sont déterminés par le choix de la colonne et des conditions de séparation,

$R_2, \pi_2^H, \sum \alpha_2^H, \sum \beta_2,$  et  $V_x$  représentent des propriétés du soluté donné,

(ii), (iii), (vi) déterminent l'interaction hydrophobique entre les solutés et les phases stationnaires,

(iv) décrit les effets des liaisons hydrogènes entre un soluté acide (donneur) et des groupements basiques incorporés dans la colonne,

(v) représente la contribution de la liaison hydrogène entre les solutés basiques et les groupements acides de la colonne à l'instar des silanols résiduels.

D'après ce modèle, dans les conditions constantes de séparation, les valeurs de r, s, a b et v caractérisent partiellement la sélectivité de la colonne. En effet ce modèle de solvation néglige d'autres paramètres qui contribuent à la rétention tels que : la sélectivité liée à la forme et la géométrie de la molécule à séparer, les interactions ioniques de type échange de cations et les phénomènes de complexation  $\pi$ - $\pi$ . Ce modèle n'est donc pas suffisamment précis pour prédire la rétention chromatographique de molécules. Le modèle de soustraction hydrophobe vient élargir la compréhension de la rétention et la sélectivité en prenant en compte toutes les interactions susceptibles d'avoir lieu au cours d'une séparation de solutés en chromatographie liquide à polarité de phase inversée.

#### 2.4.3.2.2. Le modèle de soustraction hydrophobe

Il s'agit d'un modèle développé par Jack Kirkland et repris par Snyder en 2004. Ce modèle de soustraction hydrophobe [206] est basée sur le principe de soustraction de l'hydrophobicité apportée par les greffons pour en déduire l'effet des autres types d'interactions ayant lieu pour contribuer à la sélectivité entre les composés.

$$\log \alpha \equiv \log \left( \frac{k}{k_{EB}} \right) = \underset{i}{\eta'} H - \underset{ii}{\sigma'} S^* + \underset{iii}{\beta'} A + \underset{iv}{\alpha'} B + \underset{v}{\kappa'} C \quad \text{Equation 14}$$

k est le facteur de rétention du composé à analyser

$k_{EB}$  est le facteur de rétention du soluté apolaire de référence (éthylbenzène est souvent utilisé à cause de l'absence de liaisons hydrogène, ioniques ou autres interactions polaires).

H : mesure de l'hydrophobicité de la phase stationnaire,

S : Résistance stérique de la phase stationnaire à l'insertion de molécules,

A : une mesure de l'acidité des liaisons hydrogène de la phase stationnaire

B : une mesure de la basicité des liaisons hydrogène de la phase stationnaire

C : est l'interaction de type échange de cation de groupements de la molécule à analyser avec les silanols ionisés. Ce paramètre va donc varier en fonction du pH.

$\eta'$  : paramètre mesurant l'hydrophobicité d'un soluté donné,

$\sigma'$  : évalue l'encombrement stérique de la molécule

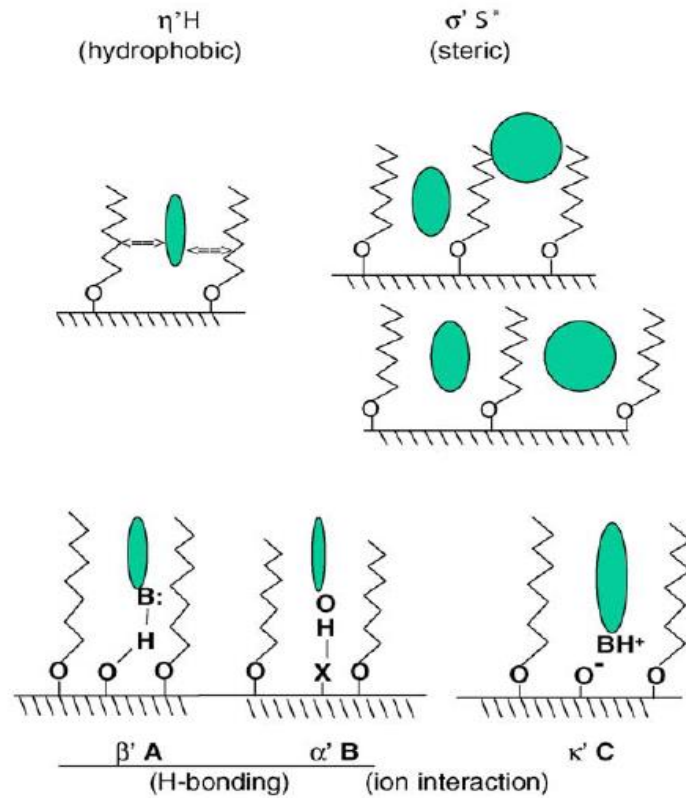
$\beta'$  : évalue la basicité de la liaison hydrogène du soluté

$\alpha'$  : mesure de l'acidité de la liaison hydrogène du soluté

$\kappa'$  : c'est l'état d'ionisation de la molécule. Ce paramètre mesure la charge approximative globale de la molécule.

D'une part, les facteurs H, S, A, B, C sont des paramètres propres à chaque colonne et d'autre part les facteurs  $\eta'$ ,  $\sigma'$ ,  $\beta'$ ,  $\alpha'$ ,  $\kappa'$  sont spécifiques à chaque soluté en fonction respectivement de leur hydrophobicité, configuration ou géométrie spatiale de la molécule et la présence de groupements acides et/ ou basiques. Aussi, il faut préciser que les termes (i), (iii), (iv) et (v) expriment des interactions attractives donc positives tandis que le terme (ii) relate une interaction répulsive donc négative.

Les différentes interactions en RP-HPLC qui sont à l'origine de la rétention et donc de la sélectivité entre les solutés telles que définies dans l'**équation 12** sont représentées ci-dessous sur la **figure 16**.



**Figure 16: Représentation schématique des cinq différentes interactions soluté-phase stationnaire de l'équation 13 [207].**

L'interaction B varie en fonction du type de colonne

### 2.4.3.3. La résolution

La résolution est définie entre deux pics consécutifs comme suit [194]:

$$R_S = \frac{2\Delta t_r}{(\omega_1 + \omega_2)} \quad \text{Equation 15}$$

Par conséquent la résolution entre deux pics est égale à 1 si la distance entre les deux pics est égale à la moyenne de leur largeur.

La résolution  $R_S$  entre deux pics est définie très souvent par la formule de Purnell [195] :

$$R_S = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_2 + \omega_1)} \quad \text{Equation 16}$$

$\omega_1$  et  $\omega_2$  sont les largeurs à la base, déterminées ci-haut par les tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base. En utilisant la largeur à mi-hauteur, on définit  $R_S$  par l'équation :

$$R_S = 1,18 \frac{(t_{R2}-t_{R1})}{(\delta_2+\delta_1)} \quad \text{Equation 17}$$

$\delta_1$  et  $\delta_2$  sont les largeurs à mi-hauteur

Pour deux pics très proches,  $\omega_1=\omega_2= \omega$  et en posant  $t_{R1} = t_{R2}$ , l'équation 16 devient :

$$R_S = \frac{t_{R2}-t_{R1}}{\omega} \quad \text{Equation 18}$$

En considérant la méthode  $4\sigma$ , l'équation 8 peut s'écrire comme ci-dessous :

$$N_2 = 16 \left( \frac{\Delta t_{R2}}{\Delta \omega} \right)^2 \quad \text{Equation 19}$$

On peut ainsi déduire que  $\frac{1}{\omega} = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \frac{1}{t_{R2}}$  Equation 20

En introduisant l'équation 20 dans 18, on obtient :

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \frac{t_{R2}-t_{R1}}{t_{R2}} \quad ; \text{ or on sait que } t_{R2} = t_m(1 + k_2)$$

D'où,  $R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \frac{t_{R2}-t_{R1}}{t_m(1+k_2)}$  Equation 21

En multipliant l'équation 21 par  $\frac{t_{R2}-t_m}{t_{R2}-t_m}$  ; on obtient

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \times \frac{t_{R2}-t_{R1}}{t_m(1+k_2)} \times \frac{t_{R2}-t_m}{t_{R2}-t_m}$$

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \times \frac{t_{R2}-t_{R1}}{t_{R2}-t_m} \times \frac{t_{R2}-t_m}{t_m(1+k_2)} \quad \text{Or } \frac{t_{R2}-t_m}{t_m} = k_2$$

Donc  $R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \times \frac{t_{R2}-t_{R1}}{t_{R2}-t_m} \times \frac{k_2}{1+k_2}$

$$\text{Aussi } \frac{t_2-t_1}{t_2-t_m} = \frac{t_2}{t_2-t_m} - \frac{t_1}{t_2-t_m} = \frac{t_2-t_m}{t_2-t_m} - \frac{t_1-t_m}{t_2-t_m} = 1 - \frac{1}{\alpha} = \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

On en déduit l'équation globale de  $R_s$  :

$$\mathbf{R_s} = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{1+k_2} \right) \sqrt{N_2} \quad \text{Equation 22}$$

En suivant la même démarche à partir des **équations 9 et 17**, on trouve l'équation suivante de la résolution :

$$\mathbf{R_s} = \frac{1,18}{2} \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{1+k_2} \right) \sqrt{\frac{N_2}{5,54}} \quad \text{Equation 23}$$

En règle générale, on parle d'une résolution satisfaisante entre deux pics lorsque  $R_s \geq 1,5$ . Toutefois, il est possible de définir une valeur seuil en fonction de la complexité de la matrice à séparer pour parler d'une séparation satisfaisante.

Il existe d'autres expressions de la résolution. En combinant l'**équation 6 et 15**, on a

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \quad \text{or} \quad \sigma = \frac{t_R}{\sqrt{N}}$$

$$\text{D'où } \mathbf{R_s} = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{t_{R2} + t_{R1}} \times \frac{\sqrt{N}}{2} \quad \text{Equation 24}$$

En exprimant l'**équation 24** en fonction du temps de rétention réduit, on obtient :

$$R_s = \frac{(t_{R2'} + t_0) - (t_{R1'} + t_0)}{(t_{R2'} + t_0) + (t_{R1'} + t_0)} \times \frac{\sqrt{N}}{2}$$

$$\mathbf{R_s} = \frac{t_{R2'} - t_{R1'}}{t_{R2'} + t_{R1'} + 2t_0} \times \frac{\sqrt{N}}{2} \quad \text{Equation 25}$$

En divisant chaque facteur de l'**équation 25** par le temps mort  $t_0$  on obtient :

$$\mathbf{R_s} = \frac{k_2 - k_1}{k_2 + k_1 + 2} \times \frac{\sqrt{N}}{2} \quad \text{Equation 26}$$

En multipliant chaque terme de la fraction par  $k_2 + k_1$ , l'**équation 26** devient :



$$R_s = \frac{k_2 - k_1}{k_2 + k_1} \times \frac{k_2 + k_1}{k_2 + k_1 + 2} \times \frac{\sqrt{N}}{2} \quad \text{Equation 27}$$

On définit ensuite par  $\bar{k}$  le facteur de rétention moyen ( $\bar{k} = \frac{k_2 + k_1}{2}$ )

Sachant que  $\alpha - 1 = \frac{k_2 - k_1}{k_1}$  et  $\alpha + 1 = \frac{k_2 + k_1}{k_1}$ , on peut simplifier l'équation 27 :

$$R_s = \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \times \frac{\bar{k}}{\bar{k} + 1} \times \frac{\sqrt{N}}{2} \quad \text{Equation 28}$$

#### 2.4.4. La capacité de pic d'une colonne chromatographique

En général, la qualité d'une séparation de mélanges complexes est appréciée par la résolution entre le couple de pics difficile à séparer. Cette grandeur ne permet pas en réalité de déduire ou qualifier à juste valeur les performances d'une séparation puisque le calcul se limite qu'entre deux pics consécutifs du chromatogramme. En effet, la grandeur chromatographique permettant la mesure du pouvoir de séparation sur l'ensemble du domaine de séparation est la capacité de pics introduite par J Calvin Giddings [208] puis reprise par C.G. Horvath [209] en 1967.

La capacité de pics est la mesure du nombre de pics qui peuvent être contenus dans une fenêtre de temps d'élution [210]  $t_1$  à  $t_2$  avec une résolution fixée. En d'autres termes, c'est l'expression du temps de rétention mesuré en unité de largeur de pics. Cette résolution est généralement fixée à 1 ce qui correspond à une valeur de 4 fois l'écart-type du pic. Dans le cas où la largeur du pic change avec le temps de rétention  $t_r$ , la capacité de pic [210] est exprimée sous la forme de :

$$n_c = 1 + \int_{t_0}^{t_r} \frac{1}{4\sigma} dt \quad \text{Equation 29}$$

$t_0$  étant le temps de rétention du composé non retenu. On considère que le gradient commence immédiatement en tête de colonne après l'injection.

La largeur de pic est une fonction du facteur de rétention  $k_e$  au point d'élution et du nombre de plateaux théoriques  $N$ .

$$\sigma = \frac{t_0}{\sqrt{N}} (k_e + 1) \quad \text{Equation 30}$$

L'équation 29 et 30 permettent d'obtenir la capacité de pic en gradient sous la forme [210] :

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \int_{t_0}^{t_r} \frac{1}{t_0} \frac{1}{k_e+1} dt \quad \text{Equation 31}$$

Le facteur de rétention au point d'élution est une fonction du facteur de rétention en gradient  $k_g$  tel que définie par Neue[210].

$$k_g = \frac{t_r}{t_0} - 1 \quad \text{Equation 32}$$

On peut ainsi exprimer la capacité de pic en fonction du facteur de rétention en gradient [210]:

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \int_0^{k_g} \frac{1}{k_e(k_g)+1} dk_g \quad \text{Equation 33}$$

Dans le cas de séparation en mode isocratique,  $\sigma$  n'est pas constant et varie selon l'équation suivante [208]:

$$\sigma = \frac{t}{\sqrt{N}} \quad \text{Equation 34}$$

En combinant les **équations 29** et **34**, en intégrant de  $t_0$  (temps mort) à  $t_r$  (temps de rétention du dernier pic), on obtient l'équation suivante [13]:

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \int_{t_0}^{t_r} \frac{dt}{t} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln(k + 1) \quad \text{Equation 35}$$

Il est important de préciser que la capacité de pic en mode isocratique est relativement faible lorsqu'on souhaite des temps d'analyse raisonnables.

Dans le cas du mode gradient, en supposant la largeur des pics du chromatogramme constant, l'intégration et la simplification de l'**équation 35** donne :

$$n_c = 1 + \frac{t_g}{\left(\frac{1}{n}\right) \sum_1^n \omega} \quad \text{Equation 36}$$

Avec  $t_g$  le temps que dure le gradient,  $n$  le nombre de pics sélectionnés sur le chromatogramme et  $\omega$  la largeur de chaque pic du chromatogramme. En effet, la largeur des pics dépend le plus souvent du type de chromatographie utilisée, de la nature des solutés du mélange et aussi de différents paramètres chromatographiques. Ce faisant, il est courant de se retrouver avec une hétérogénéité de largeur de pic sur le chromatogramme. Les pics choisis pour le calcul de la

capacité du pic ne doivent pas surestimer les largeurs de pic plus fréquentes sur le chromatogramme. Comme c'est le cas en chromatographie à polarité de phases inversée et d'échanges d'ions où la largeur des pics augmente avec la rétention dans une analyse en mode gradient linéaire, il est conseillé de choisir le premier et le dernier pic du chromatogramme. En somme, les pics sélectionnés pour le calcul doivent être représentatifs [210] de la distribution de la largeur du pic sur l'ensemble du chromatogramme.

Selon Schoenmakers, la capacité de pic ne peut être déterminée par la seule considération du temps de gradient [194] mais en prenant en compte aussi tous les pics présents et leurs caractéristiques. La capacité de pic peut ainsi être calculée comme suit :

$$n_c = \frac{\sqrt{N}}{4R_s} \ln \left( \frac{1+k_\omega}{1+k_\alpha} \right) + 1 \quad \text{Equation 37}$$

Où  $k_\alpha$  et  $k_\omega$  sont facteurs de rétentions respectivement du premier et dernier pic du chromatogramme et  $R_s$  la résolution entre chaque pair de pics successifs.

#### 2.4.5. Autres critères d'optimisation de la séparation

Il existe d'autres critères d'optimisation de la sélectivité tels que développés par Schoenmakers [194] et repris par Peeters [211] et Vanbel [212]. Parmi le panel de critères, le temps minimal requis pour la séparation d'analytes ( $[t_{ne}]_{f,d}$ : Time needed) et le nombre de plateau requis ( $N_{ne}$ ) pour avoir une résolution donnée seront examinés dans ce travail.

$$N_{ne} = \left( \frac{R_{s,ne}}{R_{s,min}} \right)^2 N_c \quad \text{Equation 38}$$

Avec  $R_{s,min}$  la résolution minimale de séparation sur le chromatogramme,  $R_{s,ne}$  la résolution requise ou définie pour une séparation satisfaisante et  $N_c$  le nombre de plateaux théorique de la colonne.

Le temps minimal requis ( $[t_{ne}]_{f,d}$ ) s'exprime en fonction du facteur de rétention et de la sélectivité minimale comme suit (à débit 'F' et diamètre des particules 'd' constant):

$$[t_{ne}]_{f,d} = \frac{1+k_\omega}{S_{min}^2} \quad \text{Equation 39}$$

Avec  $k_\omega$  : facteur de rétention du dernier pic du chromatogramme,

et  $S_{min}^2$  : facteur de séparation ou sélectivité minimale du chromatogramme.

En chromatographie liquide, la composition de la phase mobile est déterminante car d'elle dépendra la solubilisation et donc l'élution des composés d'intérêts.

## 2.5. La phase mobile

La RP-HPLC utilisée pour l'analyse des eicosanoïdes [39,40,54,65,107,119,147] a été effectuée avec des phases aqueuses contenant ou non des solvants organiques de type acétonitrile et isopropanol. Les eicosanoïdes sont séparés en fonction du volume hydrocarboné, de la présence ou non de groupements polaires, du nombre et de la position des insaturations [87]. Afin de solubiliser l'analyte, différentes interactions s'établissent entre les molécules du solvant et le soluté pour rompre d'une part les liaisons non spécifiques avec la chaîne greffée octadécyle et le soluté et d'autre part les liaisons spécifiques (type liaison hydrogène avec les silanols libres). L'usage de l'acétonitrile dans tous les travaux antérieurs pour l'analyse des eicosanoïdes peut se justifier par la présence de ses électrons  $\pi$ , et donc des interactions  $\pi$ - $\pi$  qui seront induites avec les électrons des insaturations des eicosanoïdes plus précisément les HETE. L'analyse des eicosanoïdes se fait couramment en mode gradient du fait de leur ressemblance structurale. A ce jour et à notre connaissance, il n'existe qu'une seule étude d'analyse des eicosanoïdes en mode isocratique pour l'exploration de 4 eicosanoïdes utilisés pour l'exploration de l'activation et l'inhibition de la voie des COX sur les plaquettes sanguines [142]. Même si cette analyse a été réalisée en mode isocratique, le profil des pics obtenus ne laisse pas entrevoir des espoirs en ce qui concerne une séparation efficace d'isobares et d'isomères, qui est l'un des objectifs de notre travail. Le **tableau 6** présente un état de l'art non exhaustif des démarches analytiques et les conditions chromatographiques pour l'analyse des eicosanoïdes réalisées à ce jour. Il faut préciser que les proportions de chaque solvant dans la composition de la phase mobile influent énormément sur la séparation des eicosanoïdes [51].

**Tableau 6: Récapitulatif non exhaustif des méthodes publiées en chromatographie liquide à polarité de phases inversée pour l'analyse des eicosanoïdes**

Auteur	Année	Titre	Méthode développée	Phase Stationnaire	Phase Mobile
<b>Ran Furman [54]</b>	2018	Analysis of eicosanoid oxidation products in Alzheimer brain by LC-MS with uniformly <sup>13</sup> C-labeled internal standards	LC/MS/MS (MRM) -ESI mode négatif -Potentiel de déclustérisation : - 70V -Energie d'ionisation : - 4500V. -Température gaz de séchage : 200°C. -Gaz de collision : nitrogène à 7 psi.	1×250mm Zorbax 300SB 5 µm C18 column	<b>A</b> : Eau/acétonitrile/acide formique (92 :8 :0.1, v/v/v) <b>B</b> : Acétonitrile/acide formique (100 :0.1, v/v)  <b>Débit</b> : 0.1 mL/min. <b>Volume inj</b> =20 µL
<b>Alyne Fávero Galvão [40]</b>	2016	Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment	UPLC-MS/MS (Xevo TQ-S) ESI mode négatif Optimisation des conditions d'acquisitions MRM par infusion de standards dissous dans méthanol/eau/ acétate d'ammonium (70 :30 :0.1, v/v/v)	C18 SPE Ascentis Express C18 column (100×30mm, 2.7 µm particle size)	<b>A</b> : Eau/acétonitrile/acide acétique (69.98:30 :0.02, v/v/v) <b>B</b> : acétonitrile/isopropanol (70 :30, v/v)  <b>Débit</b> : 0.6 mL.min <sup>-1</sup> <b>Solvant d'injection</b> : Méthanol
<b>Tania Petta [119]</b>	2015	Versatility of tandem mass spectrometry for focused analysis of oxylipids	UPLC-MS/MS MRM mode ESI mode négatif	C18 column (Supelco, Ascentis Express) with dimensions of 100 × 3.0mm, 2.7 µm	<b>A</b> : Eau/acétonitrile/acide acétique (69.98 : 30 : 0.02, v/v/v) <b>B</b> : acétonitrile/isopropanol (70 :30, v/v)  <b>Débit</b> : 0.6 mL/min <b>Solvant d'injection</b> : Méthanol
<b>Ali Aghazadeh-Habashi, Waheed</b>	2015	Simultaneous determination of selected eicosanoids by reversed-phase HPLC method using fluorescence detection and	Méthode améliorée de séparation et de quantification	C18 columns (2 columns of 100X 4.6 mm i.d., 3 m connected as series)	<b>A</b> : Eau/acide formique (100 :0.05, v/v) <b>B</b> : Acétonitrile/acide formique (100 :0.05, v/v)

<b>Asghar, Fakhreddin Jamali [121]</b>		application to rat and human plasma, and rat heart and kidney samples	en LC couplée à un détecteur de fluorescence (LC-FL) SPE (Conditionnement et lavage avec 3 mL d'eau et 1 mL de 10% MeOH ; élution des eicosanoïdes retenus par 2 mL d'acétonitrile anhydre)	guarded with a security Guard Cartridge C18(4.0 mm × 3.0 mm i.d.)	<b>Débit</b> : 0,8mL/min <b>Volume injecté</b> : <b>Température</b> : 30°C <b>Détection à</b> : 260 nm et 396 nm <b>Solubilisation</b> dans l'éthanol
<b>Pedro Araujo [118]</b>	2014	Development and validation of an extraction method for the determination of pro-inflammatory eicosanoids in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry	Liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry	Beck-man Ultrasphere C18 250 mm × 4.6 mm, 5 µm T° = 40°C	<b>A</b> : Eau/acétonitrile/acide formique (63 :37 :0.02, v/v/v) <b>B</b> : Acétonitrile/isopropanol (50 :50, v/v) <b>Débit</b> : 0.5 mL/min. <b>Volume inj</b> =25 µL
<b>Raquel Martin-Venegasa [51]</b>	2014	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of eicosanoids and related compounds in cell models	---	---	Phase mobile basée sur du méthanol acidifié ou acétonitrile acidifié <b>Débit</b> : 0.2 mL/min. <b>Volume inj</b> =2 à 10 µL
<b>Jafar Sadik B. Shaika, Tricia M. Millera [147]</b>	2014	Rapid and simultaneous quantitation of prostanoids by UPLC–MS/MS in rat brain	UPLC-MS/MS (Triple quadripôle) ESI négatif Mode SRM	BEH C-18, 1.7 µm (2.1 mm × 150 mm) reverse-phase column (Waters, Milford, MA) protected by a guard column (2.1 mm × 5 mm; Waters, Milford, MA) of the same packing material. T° = 55°C	<b>A</b> : Eau/acide acétique (100 :0.005, v/v) <b>B</b> : Acétonitrile/acide acétique (100 :0.005, v/v) <b>Débit</b> : 0.4 mL/min <b>Volume inj</b> =7.5 µL <b>Solubilisation dans</b> : 80 :20 Méthanol-water
<b>Brian Rago, Cexiong Fu [39]</b>	2013	Development of a high-throughput ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry assay to profile 18 eicosanoids-atherosclerosis	UPLC–MS/MS (QTRAP) ESI mode négatif MRM	(SPE, Oasis HLB) Phenomenex Synergi Fusion-RP column, (2.1 mm× 100 mm, 2.5 µm) T° = 45°C	<b>A</b> : Acétate d'ammonium/acide formique (100 :0,1, v/v) <b>B</b> : Acétonitrile/Acétate d'ammonium/acide formique (90 :10 :0.1, v/v/v) <b>Débit</b> : 0.5 mL/min <b>Solubilisation dans</b> : Méthanol
<b>Karen A. Massey, Anna Nicolaou [146]</b>	2013	Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids	LC/ESI–MS/MS Mode MRM	C18 Luna column	<b>A</b> : Eau/acétonitrile/acide acétique glacial (55 : 45 : 0.02, v/v/v)

						<b>B</b> : Acétonitrile/eau (90/10/0.02 ; v/v/v). <b>Débit</b> : 0.2 mL/min. <b>Volume inj</b> =10 µL <b>Solubilisation dans</b> : <b>80 :20 Méthanol-water</b>
<b>Linda Kortz [82]</b>	2013	Fast liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-mass spectrometry analysis of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma	On-line analysis MRM-LC/MS/MS (QqLIT)	SPE-LC–MS/MS For on-line SPE a Strata-X extraction column (20 × 2 mm i.d., 25 µm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). LC separation core–shell LC column (Kinetex C18, 100 × 2.1 mm i.d., 2.6µm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)	A : Eau/acétonitrile/acide acétique (63 :37 :0.02, v/v/v) B : acétonitrile/isopropanol (50 :50, v/v) <b>Débit</b> : 0,5 mL/min <b>Volume injecté</b> : 200 µL en SPE <b>Température</b> : 35°C <b>Solubilisation</b> Méthanol et conservation à -80°C	
<b>C. Ferreira-Vera [65]</b>	2011	Automated method for targeting analysis of prostanoids in human serum by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry in selected reaction monitoring	SPE–LC–MS/MS (QQQ) ESI mode négatif	Hysphere C8 (EC) (end-capped silica-based octadecyl phase) for SPE C18 (3µm, 150mm×4.6mm) T° = 25°C	Mode isocratique Phase mobile : Eau/Acétonitrile/acide formique (66 :34 :0,02, v/v/v) Débit : 1.0 mL/min <b>Solubilisation dans</b> : <b>Ethanol</b> • <b>Méthodes eicosanoïdes</b> Solvant A : eau/acétonitrile/acide acétique (70 :30 :0.02 ; v/v/v) Solvant B : acétonitrile/ alcool isopropylique (50 :50, v/v) • <b>Méthodes pour NAE</b> Solvant A : eau/acétonitrile/acide acétique (70 :30 :0,1 ; v/v/v) + 1g/L d'acétate d'ammonium	
<b>Darren S. Dumlao [107]</b>	2011	High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acylethanolamines	HPLC-MS/MS (QTRAP hybrid, triple quadripôle)	Synergi reverse-phase C18 column (2.1×250 mm ; Phenomenex, CA) T° = 50 °C.		

Solvant B : acétonitrile/alcool isopropylique/acide acétique (45 :45 :10 ; v/v/v) + 1g/L d'acétate d'ammonium.

Débit : 300 µL/min

Volume inj = 40 µL

**Solubilisation dans : 90µL de solvant A.**

<b>Sandra Rinne et al. [213]</b>	2007	Fast and simple online sample preparation coupled with capillary LC-MS/MS for determination of prostaglandins in cell culture supernatants	Online 2-D strong cation exchange (SCX)-RP capillary liquid chromatographic(cLC) method with IT mass spectrometric (IT-MS/MS) detection for the simultaneous Determination of prostaglandin	SPE(SCX) :(0.3 mm (id) 650mm,5µm polysulfoethylaspartamide (PolyLC,Columbia, USA). RP-LC colonne: 1 mm (id)65 mm Tracy trap column packed with 5 lm Kromasil C18 particles (G&T Septech) ; 0.3 mm (id)6100 mm, 3.5 µm Kromasil C18 (Eka-Nobel, Bohus, Sweden) analytical Column	<b>Phase mobile SPE (SCX):</b> 1 mM NH4FA (pH 3.0) – EtOH (70:30 v/v) ; Débit: 10 µL/min Débit utilisé pour la <b>dilution</b> 20 µL/min  <b>Phase mobile RP-HPLC:</b> A 30 mM NH4FA (pH 2.8), B ACN–MeOH (95:5 v/v) <b>Débit:</b> 5 µL/min.
<b>Alon Margalit, Kevin L. Duffin, and Peter C. Isakson [124]</b>	1996	Rapid Quantitation of a Large Scope of Eicosanoids in Two Models of Inflammation: Development of an Electrospray and Tandem Mass Spectrometry Method and Application to Biological Studies	SPE GC-MS/MS ESI-MRM-MS/MS( TQ)	SPE : Bond Elut C18, Analytichem Phase stationnaire: 30-m DB-5 capillary column.	Un programme de température passe de 180°C pendant 5 min, ensuite à 300°C pendant 10 min, Elution des eicosanoïdes entre 20 et 30 min Débit: 10°C/min,



### **3. La chromatographie en fluide supercritique pour l'analyse des eicosanoïdes**

La chromatographie supercritique au-delà de son gain en économie de solvant, se révèle de nos jours être très performante pour de nombreuses applications que ce soit pour des molécules pharmaceutiques comme les phospholipides [214]. Il bénéficie d'une gamme relativement large de phases stationnaires à polarité soit de phases inversée, soit de phases normale ou encore spécifique à la SFC. Sur des critères de sélectivité, la phase stationnaire 2-PIC a été sélectionnée parmi sept colonnes testées et a permis ainsi de doser 5 prostanoïdes présents dans des échantillons humains [215]. Une étude comparative entre la UHPSFC et la UHPLC pour séparer les eicosanoïdes a permis de montrer que même si la UHPSFC se démarque par sa rapidité d'analyse, l'UHPLC permet de séparer plus d'isobares et d'isomères d'eicosanoïdes avec un gain non négligeable en sensibilité [214].

### **V. Les détecteurs pour l'analyse des eicosanoïdes**

L'analyse des lipides en chromatographie liquide est complexe à cause de leur diversité structurale et l'absence de chromophores exploitables. Les détecteurs universels à l'instar du DEDL (Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière) ou du Corona® CAD sont le plus souvent utilisés pour l'analyse de lipides [216,217]. En 1978, Charlesworth a présenté le DEDL comme un détecteur de « masse » dont la réponse sera fonction de sa capacité à diffuser la lumière. [218]. Ces détecteurs DEDL et Corona® CAD ne peuvent servir qu'à une quantification de métabolites connus d'avance et ne fournissent pas d'informations structurales dans le cadre de l'analyse de matrice biologique. A ce jour, aucune méthode développée pour la séparation des eicosanoïdes n'a été mise au point avec ces détecteurs. Le Corona® CAD dérive de travaux effectués sur le DEDL. Notre développement en RHPLC pour le choix de phase stationnaire adaptée à l'analyse des eicosanoïdes a été réalisé sur le détecteur d'aérosols chargés (Corona CAD®) car ce dernier semble plus sensible aux faibles concentrations par rapport au DEDL [216]. En effet, le DEDL surestime la réponse et permet d'avoir des pics plus fins aux fortes concentrations. Toutefois, l'on sait que la réponse de ces deux détecteurs varie en fonction de la structure du soluté [219]. Nous n'aborderons que le Corona® CAD dans ce travail de thèse.

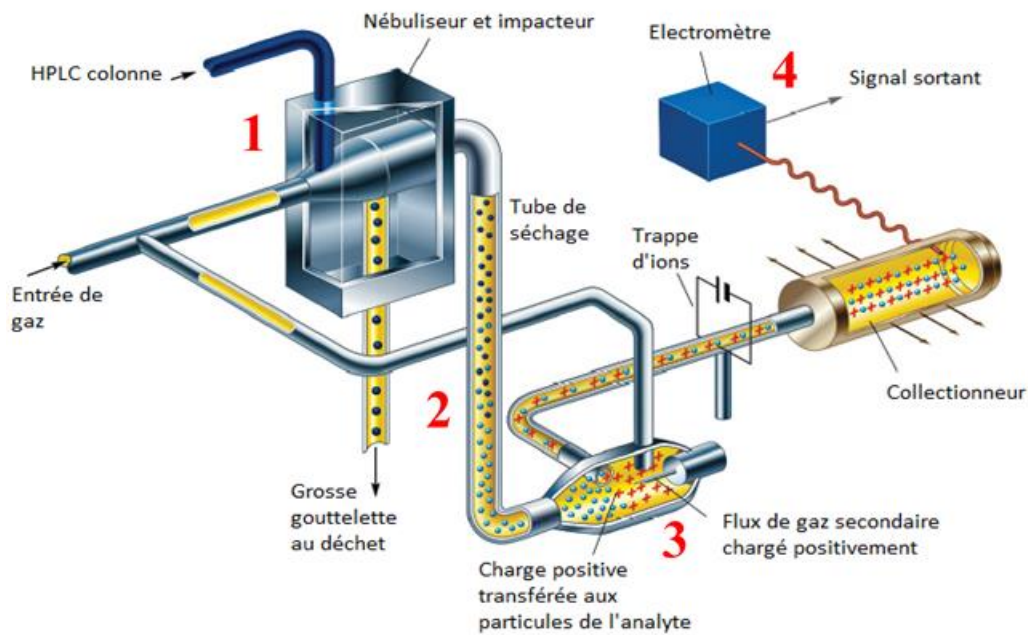
## **1. Le détecteur d'aérosols chargés (Corona® CAD)**

Le corona® CAD a été développé par Dixon et Peterson [220] dans les années 2002. Il s'agit d'un détecteur universel capable d'analyser des molécules non volatiles ou semi-volatiles. Il est le plus souvent utilisé pour détecter des composés dépourvus de chromophore et donc qui n'absorbent pas en UV. Le principal avantage de détecteur Corona est d'avoir une meilleure sensibilité à basse concentration par rapport au DEDL. Il s'agit d'un détecteur masse-dépendant dont la réponse ne dépend pas de propriétés spectrales de la substance à analyser.

### **1.1. Principe de fonctionnement du Corona® CAD**

Ce détecteur est conçu pour la détection d'aérosols chargés et offre une compatibilité parfaite avec les applications HPLC et UHPLC. Pour la détection d'aérosols chargés, un aérosol de particules d'analytes désolvatées est formé après nébulisation de l'éluant de colonne. Il s'en suit une ionisation de ces particules désolvatées via une décharge corona. Le détecteur mesure ensuite la charge. La charge mesurée est proportionnelle à la quantité d'analyte dans l'échantillon. Le principe de fonctionnement se subdivise en 4 étapes (**Fig.17**) :

- une nébulisation de l'effluent chromatographique
- une évaporation de la phase mobile
- l'ionisation des particules par l'intermédiaire d'un gaz inerte ionisé par décharge corona
- la détection des particules chargées



**Figure 17: Schéma du fonctionnement du détecteur Corona® CAD**

### 1.1.1. La nébulisation de l'effluent chromatographique

L'éluat provenant de la colonne entre dans le détecteur et est nébulisé par un nébuliseur pneumatique à l'aide d'un gaz inerte. Au laboratoire, un système de compression d'air couplé à un générateur d'azote permet de délivrer l'azote au détecteur à une pression de 35 psi. La taille des particules d'aérosol primaire formé suit l'équation décrite par Nukiyama et Tanasawa [221]. A cette étape, seules les fines gouttelettes sont acheminées jusqu'au tube d'évaporation, les plus grosses étant évacuées par un drain et recueillies dans un réservoir.

### 1.1.2. L'évaporation de la phase mobile

Les gouttelettes fines sont évaporées grâce à un tube d'évaporation chauffé. A cette étape, les solvants qui accompagnent l'éluant sont donc évaporés pour donner une particule de taille  $D_p$  qui dépend du diamètre  $D_0$  des gouttelettes de l'aérosol primaire, de la concentration  $C$  du soluté et de densité du soluté.

$$dp = D_0(C/\rho_s)^{1/3}$$

**Equation 40**

### **1.1.3. L'ionisation des particules par l'intermédiaire d'un gaz inerte ionisé par la décharge corona**

Vers la fin du tube d'évaporation, les particules d'aérosol résultantes entrent dans la chambre d'ionisation, où elles entrent en collision avec un second flux de gaz ionisé (**Fig.17, n° 3**) ayant traversé la décharge corona (2500V). Chaque particule d'aérosol désolvatée est soumise à une charge de diffusion superficielle, où le niveau de charge de la particule est proportionnel à la taille de cette dernière, et la charge cumulée de la population est liée à la quantité d'analyte.

### **1.1.4. La détection**

Dans le piège à ions, les ions présentant une plus grande mobilité et les particules de plus petites charges sont éliminés. Les particules chargées de mobilité moindre passent vers un filtre conducteur et la charge d'agrégat est mesurée avec un électromètre. Le signal est traité par la carte d'électromètre et envoyé au système de gestion de données de chromatographie.

## **2. La spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse introduit en 1910 par le britannique Joseph John Thomson, est un appareil d'analyse à des fins qualitatives, pour identifier un composé, établir sa masse moléculaire, sa formule brute ou sa structure moléculaire [222]. Elle sert beaucoup de nos jours à la quantification de molécules dans des matrices complexes. C'est le détecteur par excellence utilisé en littérature pour la quantification des eicosanoïdes dans les échantillons cellulaires comme les matrices complexes [51,66,87]. En effet, une introduction directe dans le spectromètre de masse ou un couplage par HPLC en amont permet de discriminer les eicosanoïdes, mais aussi fournit énormément d'informations structurales très utiles pour la précision dans la quantification.

### **2.1. Principe général de fonctionnement d'un spectromètre de masse**

Tous les spectromètres de masse partagent quatre caractéristiques communes à savoir : l'introduction de l'échantillon, l'ionisation, la séparation des ions par des analyseurs et la détection. L'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse est un paramètre important et dépendant de l'étape de développement, de l'analyse envisagée et du type d'ionisation. Après ionisation des molécules, les ions sont séparés selon leur rapport masse/charge et le nombre d'ions de chaque « unité » masse/charge est enregistré sous la forme d'un spectre.

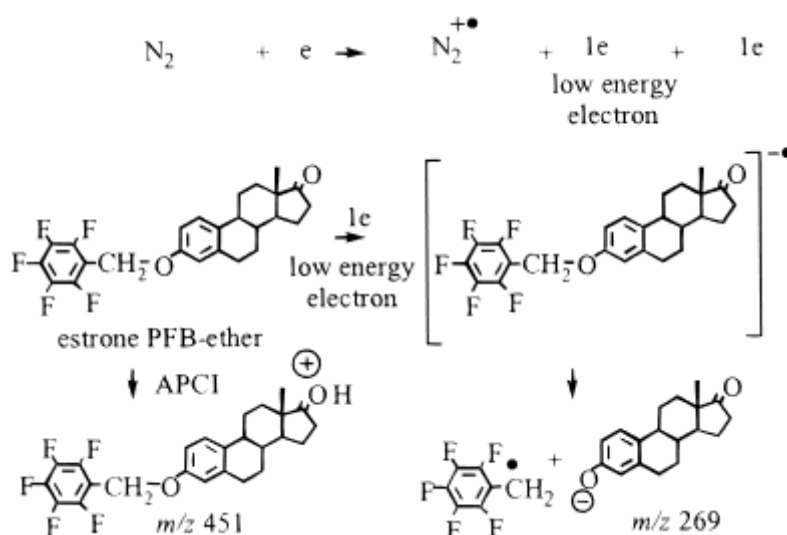
### 2.1.1. Les techniques d'ionisation

Il existe plusieurs techniques d'ionisation en spectrométrie de masse telles que l'ionisation en phase gazeuse, l'ionisation par désorption et l'ionisation par évaporation. Nous nous intéresserons uniquement à l'ionisation par évaporation car elle est la mieux adaptée pour nos molécules d'intérêt. Les deux modes d'ionisation par évaporation qui seront abordées dans ce travail de thèse sont l'electrospray ou électronebulisation et l'APCI (Atmospheric pressure chemical ionization). Il faut préciser que l'ionisation est un paramètre important car de lui dépendra l'intensité de la réponse au niveau du détecteur. Tout développement de méthode en spectrométrie de masse passe donc par un choix approprié de la source d'ionisation et une optimisation des paramètres de source et de transmission des ions (focalisation-accélération) vers l'analyseur.

#### 2.1.1.1. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

L'APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) est une technique d'ionisation en phase gazeuse, basée sur le transfert d'espèces chargées d'un ion réactif à une molécule d'analyte. Le principe est le suivant : le solvant est vaporisé par chauffage suivi d'un transfert de charge entre le cation radical azote et le solvant, enfin il y a transfert de charge entre le solvant ionisé et les molécules d'intérêts. En résumé, après ionisation des molécules de solvant, ces derniers vont ioniser à leur tour les molécules d'analyte. L'APCI a permis de nombreuses applications en lipidomique pour l'analyse de phospholipides [153,223] et d'eicosanoïdes [113,224]. L'ionisation dans des conditions APCI est initiée par le cation radicalaire  $N_2^{+}$  formé par collision entre l'azote gaz et des électrons de haute énergie issus de la décharge corona (**Fig.18**) [225]. Les électrons de faible énergie générés dans l'APCI ont été démontrés comme appropriés à l'ionisation de dérivés pentafluorobenzène d'eicosanoïdes (PGF1 $\alpha$ , 11-dehydrothromboxane B2), analysés ensuite en mode SRM sur un triple quadripôle de type TSQ 7000 Finnigan [226]. Ce mode d'ionisation s'appelle l'APCI par capture d'électron ou ECPCI (Electron capture-atmospheric pressure chemical ionization). Comparé à la méthode d'ionisation conventionnelle par APCI, la ECAPCI permet un gain en sensibilité de l'ordre de 25 à 100 fois pour l'analyse des eicosanoïdes [226,227]. Une étude d'exploration des mécanismes de fragmentations d'eicosanoïdes issus de la voie du cytochrome P450 que ce soit à partir de l'AA ou l'acide linoléique a montré des résultats similaires pour une ionisation par ESI comme APCI [228]. L'ion spécifique de  $m/z$  193 obtenu par fragmentation de la PGF2 $\alpha$  après ionisation en ESI est le même que celui obtenu après une ionisation du dérivé pentafluorobenzène de la PGF2 $\alpha$  suivie

de fragmentation [113]. En réalité, la source d'ionisation APCI est rarement utilisée pour l'ionisation des eicosanoïdes. La source d'ionisation par électronébulisation (ESI) est la plus utilisée pour l'analyse des eicosanoïdes [113].



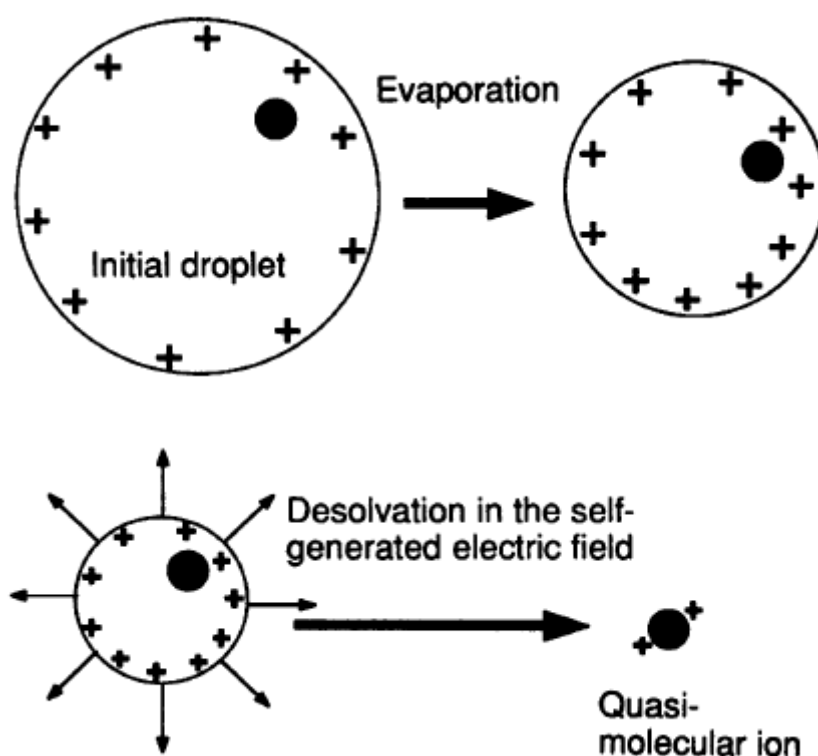
**Figure 18: Mécanisme d'ionisation par electron capture-APCI/MS [226].**

La décharge corona interagit avec l'azote pour générer des cations radicaux et des électrons thermiques de faible énergie. Ces derniers entraînent une dissociation du complexe PFB-éther avec la formation d'un ion négatif intense pour l'estrone à  $m/z$  269. Dans des conditions APCI positives conventionnelles, on obtient un ion moléculaire protoné de  $m/z$  451.

### 2.1.1.2. L'ionisation par électrospray des eicosanoïdes

L'électrospray, fruit des travaux d'Iribarne et Thomson puis de Fenn [229,230] consiste en la désolvatation d'ions générés sous l'influence d'un champ électrique intense appliqué à la surface d'un liquide. Il s'agit d'une ionisation à pression atmosphérique. En effet, le ou les analytes sont introduits dans la source d'ionisation au travers d'un capillaire métallique. Sous l'effet d'un champ électrique, le solvant est vaporisé en un fin brouillard de gouttelettes chargées. Ces gouttelettes sont ensuite progressivement évaporées par l'azote chauffé qui circule à contre-courant. La taille des gouttelettes diminue au fur et à mesure de l'évaporation jusqu'à ce que la limite de Rayleigh soit atteinte de façon que les répulsions électrostatiques entre charges de même signe à leur surface soient telles qu'il y ait explosion coulombienne de ces gouttelettes [229]. D'explosion en explosion les ions désolvatés sont finalement émis en phase gazeuse (**Fig.19**). Enfin, une série de lentilles placées sous vide permet de focaliser le faisceau d'ions à l'entrée de l'analyseur ce qui permet leur détection à l'état gazeux. L'ESI présente l'avantage

d'introduire des analytes en solution permettant le couplage à la chromatographie en phase liquide. L'ionisation est relativement douce et produit peu d'ions fragments. En revanche, le principal inconvénient de la source ESI est une baisse de sensibilité avec la présence de sels dans la phase mobile. Elle présente également des difficultés à ioniser des molécules peu polaires tels que les lipides non polaires, les molécules solubles dans des solvants tel que l'heptane ayant une faible affinité protonique [230].



**Figure 19: Diagramme schématisé d'un ion moléculaire par électronébulisation [229].**

La création de fines gouttelettes chargées est le fruit de l'électrospray appliqué sur le liquide contenant les analytes (= nébulisé). Il s'en suit une évaporation progressive jusqu'à désorption des ions.

De la nature du solvant va dépendre le type de source à choisir pour l'analyse. En effet, la nature des solvants adaptée à la source influence la section efficace des molécules et donc leur conformation. En couplage à la chromatographie à polarité de phases inversée, la source ESI (electrospray ionisation) est celle utilisée pour l'analyse des eicosanoïdes. Du fait de la possibilité de déprotonation de la fonction carboxyle des eicosanoïdes, leur analyse est préférentiellement réalisée en mode d'ionisation négative [107,133,139,231]. L'optimisation des paramètres d'ionisation en ESI (mode positif et négatif) par injection directe de standards avec différents agents d'ionisation (acide formique, acide acétique, acétate d'ammonium,

formate d'ammonium) et trois tensions de focalisation dans la gamme 2,600-3,6 kV montre une meilleure réponse des prostanoïdes en mode négatif avec une tension de source de 2,7 kV [65]. Suivant cette étude, l'acide formique a permis d'obtenir une intensité de réponse significativement plus importante comparé à d'autres agents comme l'acide acétique, l'acétate d'ammonium et le formate d'ammonium [65]. Nous n'utiliserons donc que la source ESI dans les différents développements présentés plus loin (**Partie II-Chapitre 3**).

### 2.1.2. Les analyseurs

L'analyseur a pour rôle de séparer les ions suivant leur rapport  $m/z$ . C'est également à ce niveau qu'à lieu la fragmentation si besoin pour des études de quantification ou de caractérisation. Si la résolution est le paramètre le plus connu pour un analyseur, il en existe d'autres à l'instar de : la vitesse d'acquisition, la gamme de rapport  $m/z$  et la précision de masse. La résolution se définit comme l'aptitude d'un analyseur à séparer l'ion  $M$  de l'ion  $M+\Delta M$ .

$$R = \frac{M}{\Delta M} \quad \text{Equation 41}$$

A titre d'exemple, un analyseur de résolution 2000 est capable de discriminer deux ions de masses 200 et 200.1 ou 20.00 et 20.01. La différence entre la masse mesurée ou expérimentale  $M_{exp}$  et la masse théorique ou exacte  $M_{th}$  correspond à l'erreur de mesure ou exactitude (exprimée en ppm : partie par million) selon l'équation suivante :

$$Exactitude = \frac{M_{exp} - M_{th}}{M_{th}} \times 10^6 \quad \text{Equation 42}$$

Il existe une variété d'analyseurs disponibles sur le marché. Le choix dépend des applications que l'on souhaite réaliser. **Le tableau 7** résume les analyseurs disponibles, les avantages et inconvénients ainsi que la gamme de masse.

La structure, la présence de fonctions labiles et les quantités traces d'eicosanoïdes dans les échantillons biologiques et/ ou cellulaires contraint à orienter leur analyse et leur détection avec des méthodes rapides et hautement sensibles tel un spectromètre de masse en tandem. Les principaux types d'analyseurs pouvant être utilisés pour l'analyse des eicosanoïdes sont les suivants : le triple quadripôle (TQ), la trappe ionique ainsi que des spectromètres de masse haute résolution tels que le spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (QTOF) et le LTQ-Orbitrap®. Nous n'aborderons que ces analyseurs dans les lignes à suivre. Même si l'on sait que le triple quadripôle est le SM le plus utilisé pour la quantification des eicosanoïdes, nous



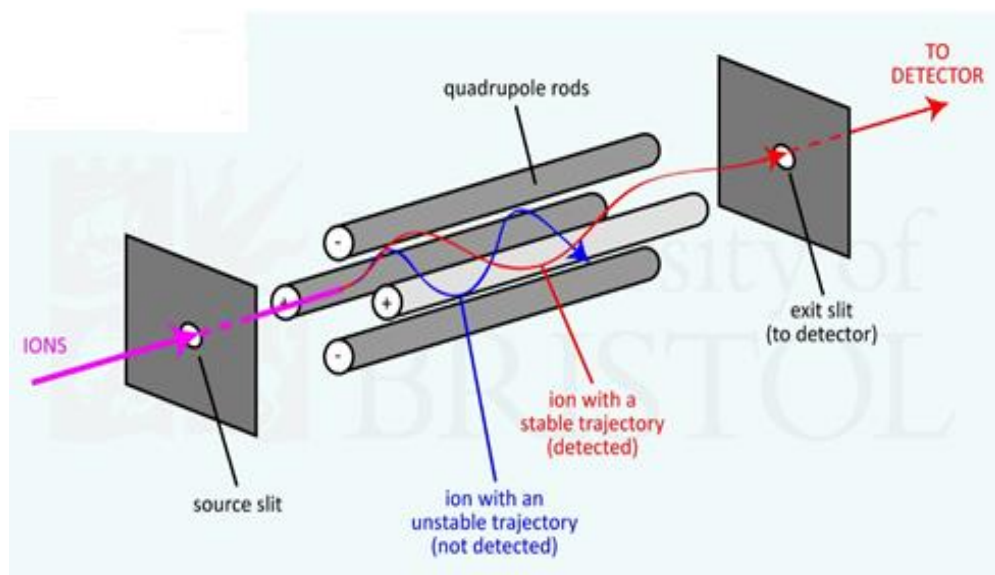
avons réalisé notre développement sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro et exploré dans quelle mesure il peut être utilisé comme une alternative au triple quadripôle dans le **chapitre 3** de la **partie II**.

**Tableau 7: Différents types d'analyseurs [232]**

Analyseur de masse	Gamme de masse ( $m/z$ )	Pouvoir de résolution	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
<b>Secteur magnétique</b>	1-15000	Haute résolution ( $10^4$ - $10^5$ )	Faible	Haute résolution	Faible sensibilité Très chère Forte expertise technique Faible résolution Gamme de masse limitée
<b>Quadripôle</b>	1-5000	Basse résolution	Grande	Facile à utiliser Bon marché Grande sensibilité	Faible résolution Gamme de masse limitée
<b>Trappe ionique</b>	1-5000	Basse résolution	Grande	Facile à utiliser Bon marché Grande sensibilité SM tandem (SM <sup>n</sup> )	Faible résolution Gamme de masse limitée
<b>TOF (Time-of flight)</b>	500000	Ultrahaute résolution	Grande	Gamme de masse Simplicité de concept	Très chère
<b>Orbitrap®</b>	5000	Ultrahaute résolution	Grande	Haute résolution Gamme de masse	Très chère Forte expertise technique

### 2.1.2.1. Le quadripôle

En 1953, Paul et Steinwedel décrivaient pour la première fois le principe de l'analyseur quadripolaire [233]. Un quadripôle se compose de quatre barreaux cylindriques parallèles entre eux, placés aux sommets d'un carré. On applique une tension continue modifiée par une radiofréquence aux barreaux. Pour chaque combinaison de tension continue et de modulation à la fréquence appropriée, seuls les ions d'un  $m/z$  donné auront une trajectoire stable et arrivent à traverser le quadripôle pour atteindre le détecteur. Tous les ions de  $m/z$  différents ont des trajectoires instables ou erratiques et percutent un des barreaux ou sortent du quadripôle (**Fig.20**). En d'autres termes, tous les ions entrent d'un côté mais seuls les ions d'un  $m/z$  donné sortent de l'autre côté. Cet analyseur sépare donc les ions en fonction de leur  $m/z$  en utilisant la stabilité des trajectoires dans un champ électrique. La trajectoire (stable et instable) des ions dépend d'une part des valeurs de ces tensions et d'autre part de leur rapport  $m/z$ .



**Figure 20: Représentation schématique d'un "filtre de masse" quadripôle ou séparateur d'ion**

Un champ quadripolaire est le résultat de l'application de deux potentiels (**Fig.21**) : un potentiel ( $\Phi_0 = U - V \cos \omega t$ ) est appliqué sur les deux barres diamétralement opposées tandis qu'un potentiel opposé ( $-\Phi_0 = -U + V \cos \omega t$ ) est appliqué sur l'autre paire (**Fig.21**),  $U$  étant une tension continue,  $V$  l'amplitude de la tension radiofréquence et  $\omega$  représente la fréquence angulaire.

Quand  $U$  est nulle, tous les ions sont transmis et le mode est appelé « RF only ». Dans ce mode, le quadripôle peut être utilisé comme un guide d'ion ou une cellule de collision quadripolaire. Parmi les modes d'acquisition disponible sur un quadripôle, il y a le mode SIM : Single Ion Monitoring. Suivant ce mode, on maintient les valeurs  $U$  et  $V$  constantes et un seul rapport  $m/z$  est transmis. A ce titre, on qualifie le quadripôle comme étant un filtre de masse réglable pour une quantification.

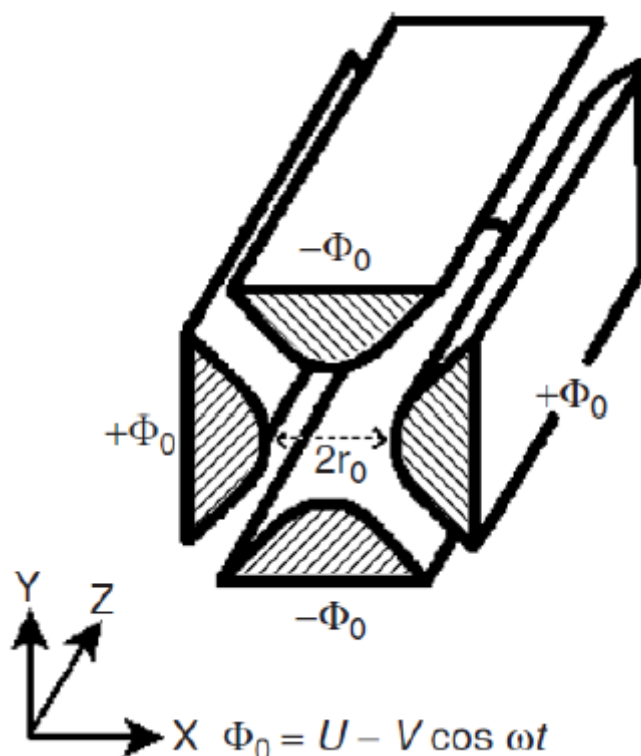
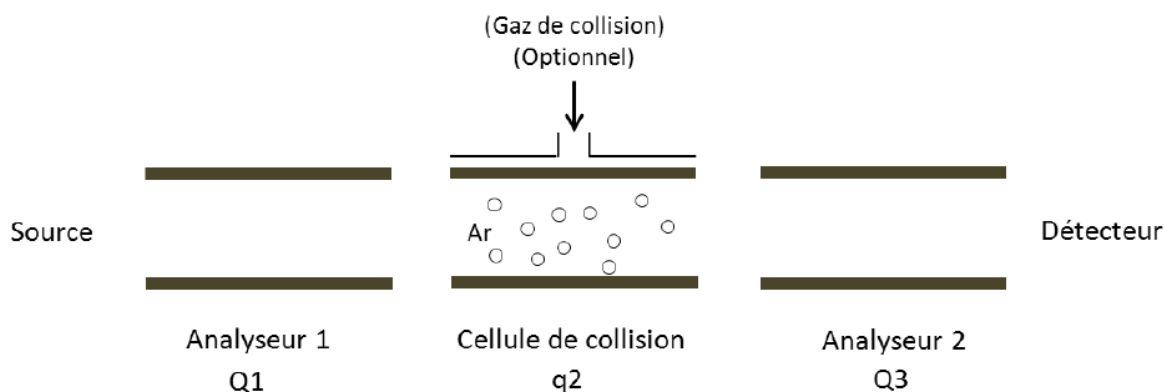


Figure 21: Représentation d'un quadripôle suivant Hoffmann et Stroobant [234].

### 2.1.2.2. Le triple quadripôle (QqQ)

Le triple quadripôle (QqQ) ou (TQ) comprend deux analyseurs quadripolaires (Q1 et Q3) séparés par un quadripôle  $q$  fonctionnant en mode « RF only » qui sert de cellule de collision suivant la figure 22.



**Figure 22: Schéma d'un triple quadripôle**

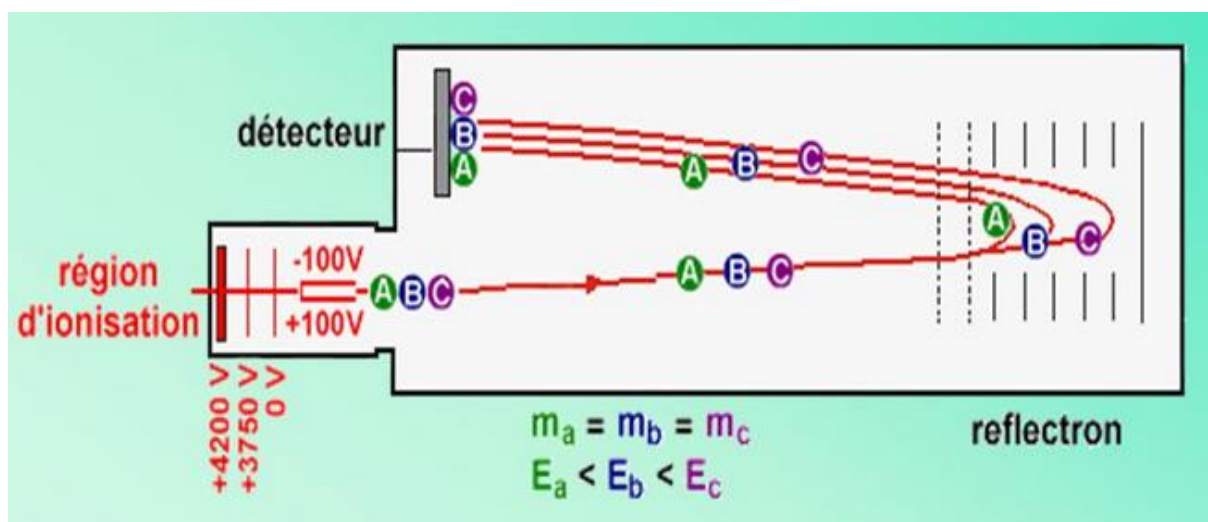
Le LCMS-8060 de chez Shimadzu que nous avons utilisé pour un profilage comparatif dans notre travail est un triple quadripôle doté d'une vitesse de balayage de 30,000 u/msec et une vitesse de changement de polarité de 5 msec, ce qui permet de suivre un nombre élevé de molécules en une seule acquisition sans perdre en sensibilité. Pour la quantification, ce TQ peut être programmé en mode SRM (Single/Selected Reaction Monitoring) ou MRM (Multiple Reaction Monitoring) dans lequel le premier quadripôle Q1 fonctionne comme un filtre de masse afin de sélectionner un  $m/z$ , l'ion sélectionné est fragmenté dans la cellule de collision q2 puis un fragment (SRM) ou plus (MRM) sont sélectionnés dans le troisième quadripôle Q3 qui fonctionne comme un filtre de masse. Ce mode d'analyse permet de quantifier des composés avec une très grande sensibilité en minimisant le bruit de fond. Il en résulte une meilleure sélectivité. Le TQ est le spectromètre de masse le plus utilisé pour doser les eicosanoïdes dans des matrices complexes [116]. L'un des critères importants pendant le développement sur un TQ est l'optimisation du dwell-time qui correspond au temps d'acquisition d'un pic. Nous reviendrons sur cet aspect dans le **chapitre 3 de la partie II**.

Il existe d'autres modes d'acquisitions sur un TQ : le balayage des ions précurseurs et le balayage de perte de neutre. Le balayage d'ions précurseurs consiste à choisir un fragment spécifique pour déterminer les précurseurs. Dans cette expérience, Q2 est configuré pour ne transmettre que les ions précurseurs d'un ion  $m/z$  sélectionné. Par conséquent, les ions dans Q1 ne seront détectés que si, après CID dans la cellule de collision q, ils proviennent de l'ion précurseur présélectionné. En analyse de perte neutre, seuls les ions qui subissent des pertes de molécules neutres présélectionnées peuvent être détectés. Ces techniques de balayage sont particulièrement bien adaptées pour explorer des substituants sur des molécules et des ions

fragments. Appliquée aux lipides, cette approche est connue sous le nom de lipidomique focalisée. La combinaison de balayage spécifique des ions précurseurs et des pertes neutres s'applique particulièrement à l'identification ciblée de phospholipides appartenant à une classe ou à une sous-classe spécifique [119]. Des travaux de fragmentation d'oxylipines sur un Xevo TQ-S en mode de balayage perte de neutre, ion précurseur et MRM ont permis à Petta, *et al.* de conclure qu'une oxylipine ayant sur son spectre de fragmentation, un ion de  $m/z$  115 correspond à une molécule hydroxylée ou époxydée sur le carbone C5 [119]. Le mode MRM est le mode d'analyse plus couramment utilisé pour l'analyse des oxylipines [107,119,141,235], car il permet d'identifier et de quantifier les espèces cibles avec un minimum d'interférences et une excellente sensibilité. Des études de quantification d'eicosanoïdes par MRM sur différents modèles cellulaires (A549, Caco-2, PC-3-S...) à l'état basal ou stimulé, rapportent des quantités de l'ordre de 10 à 500 pg/mg de protéine [51]. A partir d'une méthode en online SPE-RP-HPLC-MS/MS (TQ6410) en mode SRM permettant de suivre 7 eicosanoïdes, une limite de détection de l'ordre de 2.3 à 63.3 pg a été atteinte et a permis de réaliser un profilage des prostanoïdes du plasma de 26 individus obèses avec un IMC compris entre 30 et 40 kg/m<sup>2</sup> [65]. L'utilisation du mode MRM sur un triple quadripôle suivi du choix du fragment d'ion intense sur la base d'une carte de chaleur, a permis d'atteindre des seuils de détection allant de 1 pg à 20 pg pour des eicosanoïdes [149]. Une méthode développée à partir de 27 prostanoïdes et d'isoprostanoïdes sur un QqQ (triple quadripôle Quattro Ultima de chez Waters) en mode MRM avec un dwell time de 0.2 s a permis d'atteindre une limite de détection allant de 2 à 100 pg [140].

### **2.1.2.3. Le spectromètre de masse en tandem de type quadripôle-temps de vol**

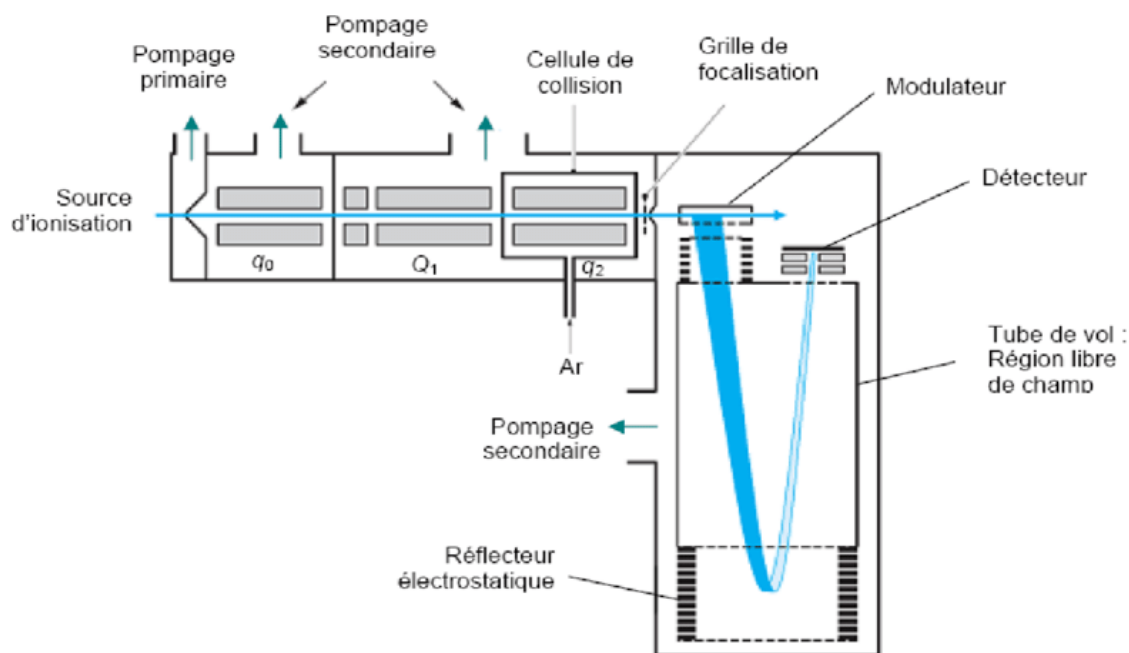
L'analyseur à temps de vol (TOF: Time of Flight) a été décrit pour la première fois par Wiley et McLaren en 1955 [236]. C'est un analyseur séparant les ions en fonction de leur temps d'arrivée au niveau du détecteur. Les ions sont accélérés par une différence de potentiel  $V$  appliqué à la sortie de la source d'ions. En effet, les ions arrivent avec leur énergie cinétique dans une zone libre de champ. Les plus légers sont les premiers détectés tandis que les plus lourds sont lents. L'aspect critique de cet instrument est la nécessité de produire les ions à des positions et temps initiaux connus. Ces contraintes limitent les spectromètres TOF à des techniques d'ionisation pulsées, dont la désorption laser et plasma (MALDI).



**Figure 23 :** Schéma du principe de fonctionnement d'un analyseur TOF équipé d'un réflectron

La **figure 24** montre le couplage d'une source continue comme l'ESI avec le Q-TOF. Ce couplage est devenu possible grâce au développement de la technique d'injection orthogonale [237]. Un modulateur est mis en place avant l'entrée du tube de vol afin de stocker puis d'injecter de façon pulsée les ions dans le TOF. C'est le cas du Qq-TOF qui est un instrument hybride composé de deux analyseurs, un quadripôle couplé orthogonalement à un TOF. Les ions sont sélectionnés dans le premier quadripôle et puis fragmentés dans le deuxième quadripôle q transformé en chambre de collision. Ensuite, les ions fragments sont refocalisés en paquets et injectés orthogonalement dans le TOF.

Un développement en chromatographie bidimensionnelle « on-line » (NPHPLCxRPHPLC) couplée au QTOF a permis de réaliser un profilage de lipides de la couche péritonéale de rat [154] et du plasma humain [238]. La haute résolution d'une méthode RP-HPLC couplée au Q-TOF (**Fig.24**) a permis de différencier diverses espèces d'isomères associées à différentes classes de lipides retrouvés dans du plasma sanguin [239]. Une autre étude d'identification et de quantification par Q-TOF (6540 MS) d'oxylipines dérivées de l'acide linoléique retrouvées dans le plasma de rat a différencié aisément les isomères de l'acide octadécaénoïque qui sont des dérivés hydroxylés en utilisant les spectres de fragmentations MS/MS et les ions spécifiques extraits par MRM [240].



**Figure 24: Schéma du principe de fonctionnement d'un Q-TOF**

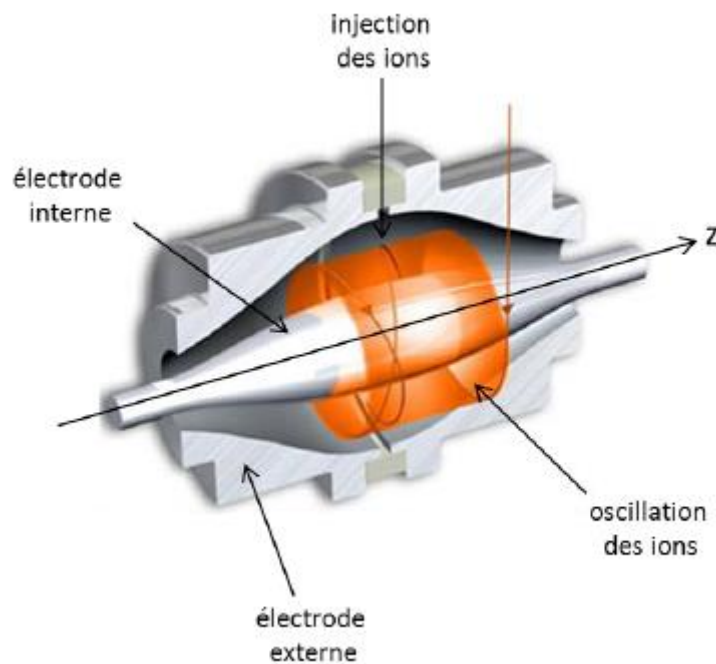
#### 2.1.2.4. Le LTQ-Orbitrap® Velos Pro

Il s'agit d'un analyseur mixte composé d'une trappe ionique linéaire en amont d'une trappe orbitale (Orbitrap®). Notre développement en spectrométrie de masse a été principalement réalisé sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro. La trappe linéaire permet d'effectuer des analyses en basse résolution à la différence de l'Orbitrap® qui permet de différencier des espèces isomères et isobares avec des pouvoirs de résolution pouvant aller jusqu'à 500000 pour  $m/z$  200 suivant la technologie.

Le piège linéaire est constitué de quatre barres d'un quadripôle fermé par deux plaques de piégeage d'entrée et de sortie qui assurent le confinement des ions de façon axiale à l'intérieur du quadripôle [232], en appliquant une tension continue positive pour piéger les ions positifs et de polarité inverse pour les ions négatifs. Ce type d'analyseur permet d'éjecter les ions de deux façons: radiale ou axiale [234].



L'Orbitrap® est le fruit en 2000 des travaux de Alexander Makarov [241]. La **figure 25** montre que l'Orbitrap® est formé d'une électrode externe en forme d'olive coupée en deux parties égales séparées par un espace étroit et d'une électrode interne coaxiale en forme de fuseau. Les ions sont injectés tangentiellement, par l'espace séparant les deux moitiés de l'électrode externe, dans le champ électrique existant entre les électrodes et sont piégés car leur attraction électrostatique vers l'électrode interne est contrebalancée par la force centrifuge [241,242]. Le principe de l'Orbitrap® est le suivant : chaque ion entrant dans l'Orbitrap® aura un mouvement de rotation autour de l'électrode et un mouvement axial le long de l'électrode. La fréquence axiale des ions est dépendante de leur rapport  $m/z$ . La détection dans l'Orbitrap® se fait par mesure du courant induit par le déplacement latéral des ions suivi d'une transformation de Fourier du signal.



**Figure 25: Schéma d'un Orbitrap®**

Quand la trappe linéaire est couplée avec un Orbitrap® (LTQ-Orbitrap®) (**Fig.26**), l'éjection des ions, sélectionnés à basse résolution dans la trappe, de façon radiale permet leur détection par un double détecteur situé sur deux des côtés du piège linéaire. L'éjection axiale permet

d'envoyer les ions vers un autre analyseur, comme l'Orbitrap®, afin d'effectuer une analyse en haute résolution. On distingue quatre modes de fonctionnement pour le piège à ions qui sont :

- 1) le piégeage des ions
- 2) la mesure de la masse des ions accumulés
- 3) l'isolement d'un ion
- 4) la fragmentation d'un ion par CID (Collision Induced Dissociation)

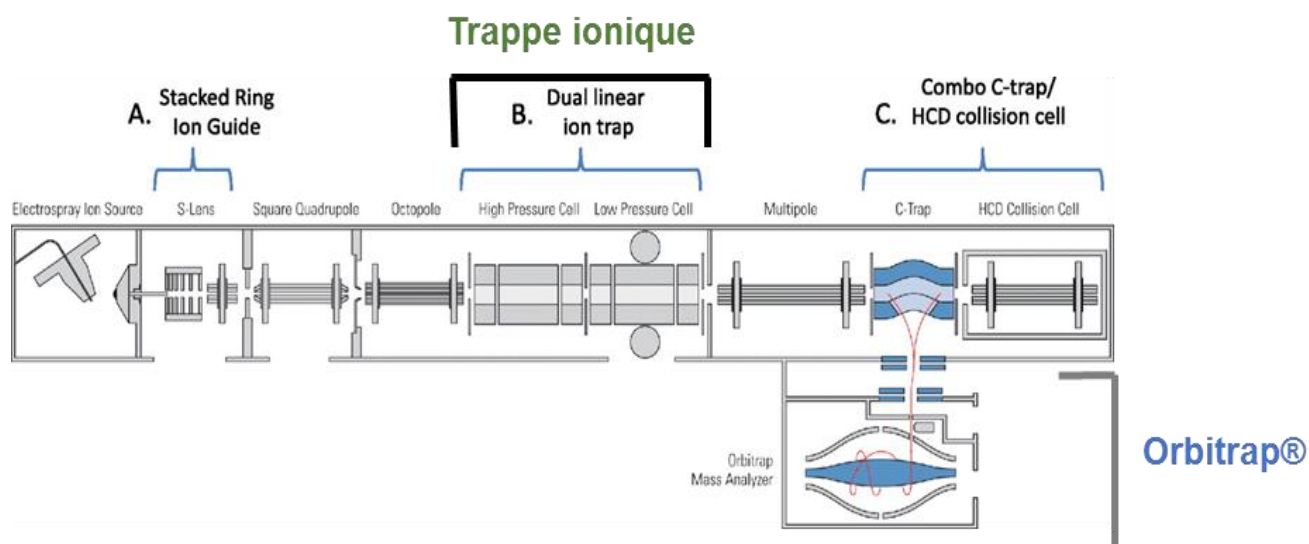
Pour réaliser un spectre MS, les étapes 1 et 2 sont enchaînées et pour un spectre MS<sup>2</sup>, l'ordre des étapes correspond à 1, 3, 4 et 2. Les pièges permettent de reproduire plusieurs fois les étapes 3 et 4. Cette propriété permet de réaliser n fois des expériences MS/MS, c'est-à-dire de réaliser des MS/MS de MS/MS de MS/MS (n fois). Ceci permet donc d'établir des filiations au cours de la fragmentation successive des ions obtenus et sélectionnés dans le cadre de l'exploration de la structure d'une molécule inconnue.

Le LTQ-Orbitrap® Velos Pro (**Fig.26**) est le spectromètre de masse sur lequel nous avons réalisé notre développement pour la quantification des eicosanoïdes. Il s'agit d'un spectromètre de masse équipé d'une source HESI-II, d'un piège à ions linéaire et de l'Orbitrap® qui permet des mesures de masses précises à haute résolution (jusqu'à 100000). La fragmentation des ions est possible soit dans le piège à ions de façon résonante, soit dans la cellule de collision HCD (Higher Energy Collision Dissociation) dans un mode non résonant.

Le piège à ions linéaire est composé de deux cellules quadripolaires de pressions différentes. La cellule à « relativement » haute pression est optimisée pour capter le maximum d'ions, et permet de fragmenter les ions précurseurs dans le mode CID résonant (Collision-Induced Dissociation CID). La deuxième cellule à plus basse pression permet un balayage rapide des ions fragments [243]. Dans le mode HCD, les ions sont d'abord accumulés dans la C-trap avant d'être fragmentés dans la cellule HCD pour être analysés à haute résolution par l'Orbitrap®. Il est important de préciser que sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro, il est possible de fragmenter en HCD ou CID avant une détection des ions en haute résolution. En revanche, en basse résolution, on ne peut détecter que les fragments issus d'une fragmentation par CID. Les deux modes CID et HCD sont des techniques de fragmentation qui reposent sur le même principe à savoir la collision de molécules avec un gaz inerte. Pendant le processus d'excitation, les ions entrent plusieurs fois en collision avec le gaz inerte. Chacune de ces collisions peut "chauffer"

ou "refroidir" l'ion. En excitation résonante seuls les ions précurseurs sont accélérés et se fragmentent en ions fils. Les ions fragments sont quant à eux « thermalisés » lorsqu'ils entrent en collision avec le gaz. Contrairement au mode CID de la trappe ionique, les ions fils produits restent excités et ne subissent pas suffisamment de collisions pour les « refroidir », ce qui signifie que s'ils entrent en collision avec des molécules de gaz, ils peuvent se fragmenter par la suite. En terme clair, dans le mode résonant (CID) du piège à ion, seul l'ion parent (précurseur) est excité contrairement au mode non résonant du HCD où l'ion parent ainsi que les ions fils sont excités. Pour tenter d'expliquer les différentes modes de fragmentations dans une étude lipidomique de médiateurs lipidiques, Masoodi, *et al.* [145] rapporte que ces différences peuvent s'expliquer par différents modes d'activation dans les deux régions différentes à savoir une activation par résonance sélective de l'ion précurseur dans le CID versus une activation par collision multiple non sélective pour l'HCD.

Le LTQ-Orbitrap® est un instrument hybride qui combine la sensibilité et vitesse du LTQ avec les hautes précision de mesure de masse et résolution de l'Orbitrap [244,245]. Le piège à ion linéaire est doté d'une vitesse d'acquisition plus grande par rapport à l'Orbitrap®. Les spectres de fragmentation par HCD des eicosanoïdes sont similaires à ceux obtenus sur un triple quadripôle [145]. Pour tirer parti des performances des deux analyseurs, nous avons mis à profit dans cette thèse la grande vitesse d'acquisition de la trappe ionique pour sélectionner et isoler les ions les plus intenses (les deux ions les plus intenses dans cette étude), ensuite après fragmentation par HCD, les ions fragments sont analysés par l'Orbitrap®. Nous reviendrons en détail sur ce développement dans le **chapitre 3 (Partie II)** de notre travail de thèse.



**Figure 26: Représentation schématique du LTQ-Orbitrap® Velos Pro**

Des formats de spectromètre de masse en tandem de type Q-TRAP sont également disponibles sur le marché et sont utilisés pour répondre aux problèmes de quantification d'isobares d'eicosanoïdes. Des travaux récents de Rago, *et al.* réalisées en RP-HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem équipée d'un analyseur type piège à ions à quadripôle (QTRAP) pour la séparation des eicosanoïdes suivi d'outils chimiométriques ont permis d'effectuer une classification par clustering (partitionnement de données) de patients suivant l'état d'évolution de leur athérosclérose [39]. Les travaux de Dumlao, *et al.* réalisés sur une QTRAP 4000 ont permis de suivre 141 eicosanoïdes par MRM et d'atteindre une LOD de l'ordre de 0,1 à 1 pg [107]. En revanche ceux de Kortz, *et al.* effectués sur une QTRAP 5500 a permis de suivre 123 molécules et d'atteindre une LOD de l'ordre de 200 à 1000 ng/mL [82]. Un dwell-time de 25 ms a permis d'obtenir 9 points par pic et permis de suivre environ 70 eicosanoïdes sur une Q-TRAP 4000 ABSciex dans le cadre de la quantification de médiateurs lipidiques impliqués dans les processus inflammatoires dans le système nerveux de rat [133]. L'optimisation de ce dwell-time est particulièrement déterminant pour obtenir une fréquence d'acquisition satisfaisante.

#### **2.1.2.4.1. Différentes stratégies d'acquisitions en spectrométrie de masse pour la quantification des eicosanoïdes.**

## **Le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring)**

La MRM est réalisée en isolant l'ion précurseur dans le premier quadripôle (Q1), en le fragmentant dans Q2 et en surveillant les ions fragments les plus intenses à l'aide de Q3. Le mode SRM est basé sur le même principe à la différence qu'un seul ion fragment est suivi au niveau du Q3. Autrement dit, on va focaliser l'analyseur après fragmentation sur un ion d'intérêt. La sélectivité et la spécificité sont obtenues grâce à une combinaison de deux facteurs : le premier analyseur (qui isole uniquement les ions précurseurs dans une fenêtre de masse étroite) et un deuxième analyseur Q3 (qui suit les ions fragments spécifiques correspondant aux ions précurseurs). La sélectivité augmente généralement lorsque plusieurs transitions sont surveillées pour le même ion précurseur. La sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage car les deux analyseurs sont maintenus à une tension constante, faisant de la MRM un mode de choix pour la quantification. La MRM est la principale méthode d'analyse utilisée pour l'analyse des oxylipines, car elle permet d'identifier et de quantifier les espèces cibles avec un minimum d'interférences et une très bonne sensibilité [87,116,119,148]. Le mode SRM a permis de suivre un ensemble de prostanoïdes dans le cerveau de rat [147], dans le sérum humain [65] et pour la quantification de 7 isoformes de PGF2 $\alpha$  chez des femmes enceintes [246]. Nous avons réalisé un développement en mode MRM sur le LCMS-8060 qui sera présenté dans le **chapitre 5 de la partie II**.

## **Le mode SIM (Single Ion Monitoring)**

A la différence du mode MRM qui permet de suivre plusieurs ions simultanément dans une même fenêtre, le mode SIM ne permet de suivre qu'un seul ion. Le mode SIM sur une méthode en GC-MS/MS pour le suivi de quatre prostanoïdes a permis de comparer le plasma de 5 personnes saines [111]. Une autre méthode de quantification des eicosanoïdes sur un système Agilent 1100-series LC-MSD équipé d'un simple quadripôle associé à une détection sélective de masse [247] a permis de suivre 23 eicosanoïdes par SIM sur un profil divisé en 4 segments, atteignant des LOD de l'ordre de 1.6 à 15.7 pg pour les prostanoïdes et de 10 pg pour les DiHETE et HETEs.

## **Le mode Data Dependent Acquisition (DDA)**

En mode DDA, le spectromètre de masse sélectionne les ions les plus intenses à partir d'un balayage en full scan. Ces derniers sont ensuite fragmentés et analysés pour renvoyer un spectre MS/MS par ion précurseur sélectionné dans le full scan. Pour que les ions en full scan soient sélectionnés pour une fragmentation, il faut qu'ils dépassent un certain seuil d'intensité

préalablement défini dans la méthode d'acquisition [248–250], ou autres critères tels que le défaut de masse ou une perte neutre [249]. Dans ce mode, les précurseurs sont sélectionnés dans une fenêtre d'isolement étroite, en général inférieure ou égale à 1 Da pour obtenir des spectres de très bonne qualité et informatifs [251]. Defossez, *et al.* [252] ont rapporté récemment huit critères à prendre en compte au cours du développement d'une méthode en mode DDA. Théoriquement, tous les spectromètres de masse en tandem sont capables d'effectuer des acquisitions en mode DDA mais très souvent, les travaux effectués à base de DDA sont effectués sur des Q-TOFs et l'Orbitrap® [252]. Au vu de la complexité structurale des eicosanoïdes, très peu d'études font recours au mode DDA pour l'analyse des eicosanoïdes. Après catégorisation en 12 groupes d'oxylipines sur la base de leur masse exacte pour en établir une liste d'inclusion, une acquisition en mode DDA en fragmentant les 5 ions les plus intenses sur le LTQ-Orbitrap® (full scan avec une résolution de 30000 suivi d'un MS/MS et détection des ions fragments avec une résolution de 7500) a permis de réaliser un profilage de médiateurs lipidiques dans un modèle cellulaire de leucémie lymphocytaire chronique [145]. Une autre étude en approche protéomique et lipidomique conduite sur une Q Exactive Orbitrap® en mode DDA (MS/MS et détection des ions fragments avec une résolution de 17500) en fragmentant les 6 ions les plus intenses, a permis de réaliser un profilage des eicosanoïdes de fibroblastes humains dépendant de l'action de la dexaméthasone [253]. Notre développement en mode DDA a été effectué sur un spectromètre de masse en tandem de type LTQ-Orbitrap® Velos Pro. Parmi les critères à optimiser pour une acquisition en mode DDA [252], une attention particulière a été portée sur l'optimisation des énergies de collisions de chaque molécule ciblée, sur le nombre d'expériences MS/MS par cycle pour obtenir une fréquence d'acquisition satisfaisante pour notre quantification, et sur la définition du seuil. En revanche, certains critères comme l'exclusion dynamique, la définition d'une liste d'exclusion et la fenêtre d'isolement mis par défaut à 1 uma n'ont pas fait l'objet d'étude approfondie. Nous reviendrons sur ces différents aspects dans le développement de notre méthode de détection sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro (**Partie II-Chapitre 3**). L'un des inconvénients du mode DDA, est que très souvent, les molécules de faible intensité qui sont des molécules biologiques potentiellement importantes ne sont pas détectées [249,251]. Pour une analyse non-ciblée, le mode data independent acquisition a été utilisé pour la découverte et l'identification structurale de molécules inconnues [251].

## **Le mode Data Independent Acquisition (DIA)**

En mode DIA, le spectromètre de masse va fragmenter tous les ions retrouvés dans une fenêtre d'isolement plus large de l'ordre de 10 à 50 Da [251] sans seuil d'intensité prédéfini [248]. En effet, pour chaque cycle de DIA, le spectromètre de masse va se concentrer sur une zone donnée et fragmenter ainsi tous les précurseurs détectés. L'un des avantages de ce mode est qu'il permet la fragmentation de plusieurs ions précurseurs simultanément dans une fenêtre d'isolement plus grande que celle que soit leur intensité. Il en résulte un spectre très complexe à interpréter [249]. L'annotation des pics aussi devient très difficile et nécessite souvent des outils chimiométriques et des bases de données. Toutefois, ce mode est très utilisé dans des analyses non ciblées et a été démontré comme complémentaire au DDA dans une étude métabolomique non ciblée [251]. Du fait de la faible vitesse de balayage, fruit de l'acquisition simultanée d'expériences MS et MS/MS de plusieurs ions, les analyses DIA ne sont souvent pas conduites pour des études d'analyses de traces sur un spectromètre de masse haute résolution à l'instar de l'Orbitrap®. Etant donné que nous sommes en approche ciblée dans ce travail de thèse, nous n'avons pas exploré le mode DIA.

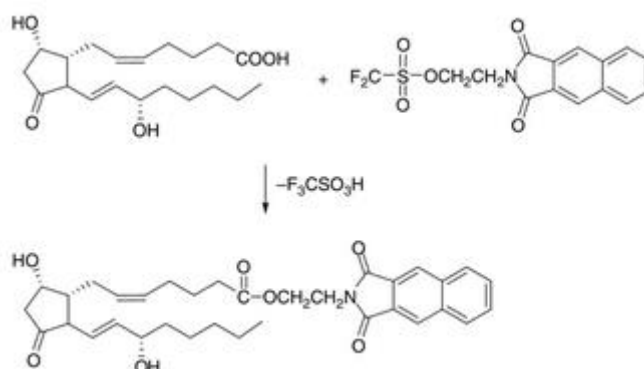
### **2.1.3. Le détecteur**

Les ions en provenance des analyseurs sont ensuite détectés par un système capable de transformer un signal ionique en un signal électrique mesurable. Le détecteur le plus utilisé est un multiplicateur d'électrons. Il sert à mesurer le nombre d'électrons et à amplifier le signal pour atteindre une bonne sensibilité. Ensuite le signal est enregistré et un spectre de masse est produit.

## **3. Autres détecteurs pour l'analyse des eicosanoïdes**

Un détecteur de fluorescence [121,142] a été utilisé pour l'analyse des eicosanoïdes mais de nombreuses difficultés subsistent. En effet, l'HPLC avec détection par fluorescence requiert une dérivation préalable. Avec une longueur d'onde de 365 et 411 nm, une étude de quantification des eicosanoïdes de plaquettes sanguines avec un détecteur de fluorescence a été rendue possible grâce à une dérivation avec un agent ADAM (9-Anthryl diazomethane) [142]. Une étape de dérivation par adjonction du 2-(2,3-naphtalimino)ethyl trifluoromethanesulfonate (*NE-OTf*) à la fonction hydroxyle des eicosanoïdes (**Fig.27**) permet d'augmenter la sensibilité de détection par fluorescence [121,254]. Les longueurs d'onde

d'excitation et d'émission qui étaient respectivement de 260 et 396 nm n'ont pas permis de donner d'informations structurales sur certains pics inconnus. Néanmoins, ces travaux ont permis de montrer que le profil quantitatif et qualitatif en métabolites issus de l'acide arachidonique est tissus-dépendant (plasma, cœur, rein) [121]. Les inconvénients de ce type de détection sont l'allongement du temps de préparation d'échantillons et des difficultés pour la dérivatisation de certaines molécules.



**Figure 27:** Schéma de dérivatisation de la PGD2 par le 2-(2,3-naphtalimino)éthyl trifluoromethanesulfonate (NE-OTf) [254].

La détection des eicosanoïdes par UV n'est pas spécifique en raison du fait que plusieurs eicosanoïdes partagent les mêmes longueurs d'onde d'absorption [143]. En raison de l'absence de chromophores exploitables sur les eicosanoïdes, le développement de notre méthode chromatographique a été réalisé avec un détecteur d'aérosol chargé Corona CAD. Cependant, pour accéder aux informations structurales sur des échantillons cellulaires, un couplage à la spectrométrie de masse reste nécessaire.

## VI. Problématique liée à l'analyse des eicosanoïdes

L'instabilité des eicosanoïdes liée à leur structure est rapportée dans plusieurs études [84,121,247,255]. Une étude de stabilité a permis de montrer l'existence de différents degrés de stabilité dépendant de la structure: certains sont stabilisés par la présence d'ovalbumine [132] et d'autres dans du solvant organique acidifié [256]. Cao, *et al.* [92] ont démontré que la PGE2 était dégradée dans le milieu de culture après conservation pendant 24 h à température ambiante



ou pendant 4 semaines à -20°C en milieu de culture. L'instabilité tient également son origine du nombre élevé d'insaturations sur les dérivés de l'EPA et la présence d'acides aminés sur les peptido-leucotriènes. De plus, les eicosanoïdes circulants dans le sang sont généralement métabolisés par bêta ou oméga oxydation. Il existe donc un fort risque que ces molécules s'oxydent en d'autres molécules, compliquant ainsi les processus de quantification. Les eicosanoïdes et leurs métabolites sont dans le sang à l'état de traces, de l'ordre du picomolaire au nanomolaire. En résumé, quelle que soit la technique de dosage utilisée, l'analyse des acides gras polyinsaturés (AGPI) oxygénés se trouve confrontée à trois problèmes majeurs :

- Ils sont présents à des concentrations extrêmement faibles dans les tissus biologiques.
- Ils ne sont pas stockés dans les tissus mais formés transitoirement à la demande d'un processus biologique particulier à un moment précis et ont donc une stabilité limitée.
- Ces AGPI précurseurs des eicosanoïdes peuvent être oxydés en différentes positions de la chaîne alkyle, conduisant ainsi à plusieurs isomères, chacun avec un rôle métabolique spécifique.

L'évaluation quantitative de ces métabolites est complexe, principalement en raison de leur diversité biologique et de leur similarité structurale. A titre d'exemple, la PGE2 et la PGD2 sont deux métabolites de la voie des COX ayant la même formule moléculaire et se différencient l'un de l'autre par la présence d'une fonction cétone ou hydroxyle en position 9 et 11. L'analyse d'un mélange contenant ces deux métabolites en MS/MS produit les mêmes ions fragments en raison de leur ressemblance structurale [107]. De ce fait, une séparation suffisante en amont par HPLC permettrait de mieux distinguer ces espèces structurellement proches. Le mode MRM du triple quadripôle est couramment utilisé pour le suivi des eicosanoïdes plus précisément les isomères et isobares dans les échantillons biologiques [1,2]. Ces modes d'acquisitions MRM en spectrométrie de masse [82,107] permettent de surmonter la difficulté de la séparation et la quantification des espèces très proches comme les HETE et HODE (ces métabolites produisant plusieurs ions fragments identiques même s'ils n'ont pas un même nombre de carbone de base). Cependant, la grande spécificité de la MRM peut limiter la détection d'espèces dont les transitions  $m/z$  ne sont pas couvertes par la méthode. De plus, ce mode d'acquisition n'est pas suffisant lorsque des isobares partageant les mêmes fragments spécifiques ne sont pas séparés en amont du spectromètre de masse. Aussi l'analyse des méthodes de séparation des eicosanoïdes dans la littérature révèle que de nombreux problèmes de séparation d'espèces minoritaires et de co-élutions subsistent [39,82,87,133]. À la lumière des rôles mécanistiques

clés des eicosanoïdes dans la pathogenèse de l'athérosclérose, une séparation fiable des eicosanoïdes pourrait être bénéfique pour la sélection de biomarqueurs de précision dans un but de faciliter le diagnostic, l'évolution de la maladie et l'évaluation pharmacodynamique des processus inflammatoires.

Dans le but de mieux comprendre la variation d'efflux du cholestérol suite à l'incorporation de l'EPA dans la membrane de macrophages [35], les objectifs spécifiques de ce projet sont subdivisés en trois.

- Primo, il s'agira de développer et optimiser une méthode de séparation des eicosanoïdes en chromatographie liquide pour résoudre les problématiques liées à la coélution d'isobares et d'isomères d'eicosanoïdes du fait d'une sélectivité non satisfaisante des phases stationnaires utilisées dans la littérature
- Secundo, développer une méthode de détection des eicosanoïdes par spectrométrie de masse LTQ-Orbitrap® en mode DDA
- Tertio, une quantification des eicosanoïdes (relargués par des macrophages J774 et THP-1 dans différentes conditions inflammatoires) par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro). Le but ici est de tenter de relier la variation d'efflux du cholestérol à la variation au sein de la population d'eicosanoïdes.

**Partie II: Travaux expérimentaux-  
Développement de méthodes  
séparatives et de détection pour  
l'analyse des eicosanoïdes cellulaires**

**Chapitre 1: Développement de méthodes de  
séparation des eicosanoïdes par  
chromatographie liquide à polarité de phases  
inversée**

L'évaluation quantitative des eicosanoïdes est complexe, principalement en raison de leur diversité biologique et de leurs similarités structurales [87,101,116]. Nombre de méthode de dosage des eicosanoïdes dans les matrices biologiques font appel à la RP-HPLC en amont de la spectrométrie de masse en mode MRM [87,257]. Cependant, le mode MRM ne permet pas de suivre deux isobares co-élusés et partageant les mêmes spectres de fragmentation. De plus, les phénomènes de suppression d'ions d'espèces minoritaires et les difficultés de séparation des isomères et isobares d'eicosanoïdes en RP-HPLC compromettent la fiabilité du dosage. Pour ce faire, une meilleure sélectivité de séparation par un choix de phase stationnaire appropriée permettrait d'améliorer le suivi de ces molécules dans les échantillons biologiques. L'objectif de cette étude est de proposer une stratégie aboutissant au choix de phase stationnaire à polarité de phases inversée appropriée à la séparation des oxylipines sur la base du modèle de soustraction hydrophobe.

## I. Matériel et Méthodes

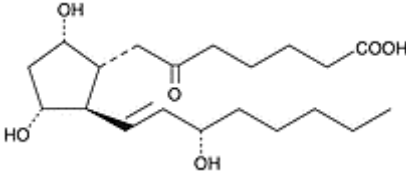
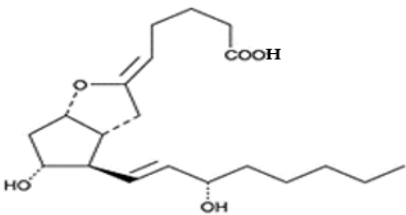
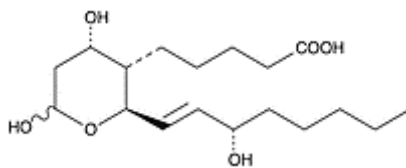
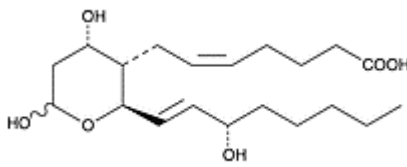
### 1. Matériel

#### 1.1. Solvants et standards

L'eau et l'isopropanol de qualité HPLC-MS ont été obtenus respectivement auprès de VWR et Biosolve. L'acétonitrile et le méthanol de qualité HPLC ainsi que l'acide formique utilisés pour le développement en RP-HPLC ont été fournis par Sigma Aldrich.

Au total 29 molécules y compris les oxylipines et les AGPI ont été obtenus auprès de CAYMAN chemical (Ann Arbor, MI, USA). Il s'agit de : 6-keto-PGF1 $\alpha$ , PGI $_2$ , TXB $_1$ , TXB $_2$ , PGE $_3$ , PGF $2\alpha$ , PGE $_2$ , PGD $_2$ , LXA $_4$ , ( $\pm$ )14(15)-DiHETE, LTB $_4$ , LTD $_4$ , ( $\pm$ )5(6)-DiHETE, ( $\pm$ )5-HEPE, ( $\pm$ )20-HDHA, ( $\pm$ )9-HODE, ( $\pm$ )15-HETE, ( $\pm$ )12-HETE, ( $\pm$ )11-HETE, ( $\pm$ )8-HETE, ( $\pm$ )5-HETE, ( $\pm$ )8(9)-EET, CTA $_2$ , ( $\pm$ )14(15)-EET, acide eicosapétaénoïque ou EPA, l'acide arachidonique ou AA, l'acide palmitique, l'acide linoléique et l'acide oléique. Pour les besoins du développement, nous nous sommes procurés également un mélange de prostanoïdes composés du 6-Céto-PGF1 $\alpha$ , TXB $_2$ , PGF $2\alpha$ , PGE $_2$  et PGD $_2$  et un deuxième mélange de HETEs (( $\pm$ )15-HETE, ( $\pm$ )12-HETE, ( $\pm$ )11-HETE, ( $\pm$ )8-HETE, ( $\pm$ )5-HETE). L'ensemble des oxylipines ainsi que les précurseurs ayant servi au développement en chromatographie liquide à polarité de phases inversée sont répertoriées dans le **tableau 8**.

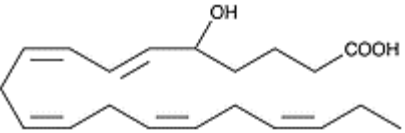
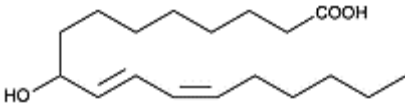
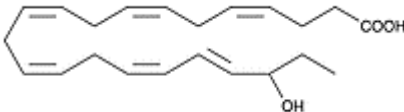
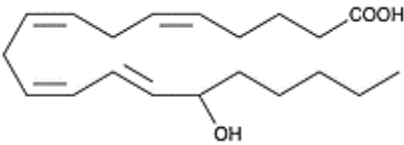
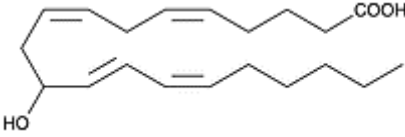
**Tableau 8: Tableau résumant les noms des standards de l'étude, leur structure et quelques caractéristiques**

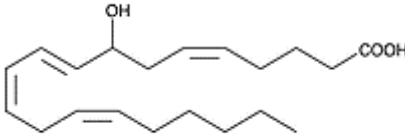
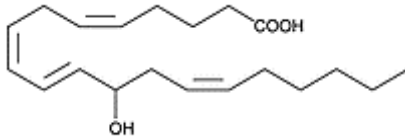
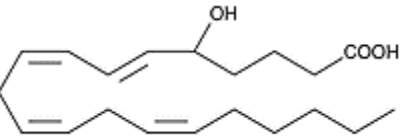
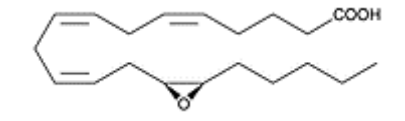
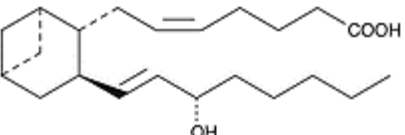
<i>Systematic name</i>	<i>Synonym</i>	<i>Lipidmaps ID</i>	<i>Formula</i>	<i>Exact mass</i>	<i>Structure</i>
<b>6-oxo-9<math>\alpha</math>,11<math>\alpha</math>,15S-trihydroxy-prost-13E-en-1-oic acid</b>	6-Keto-PGF1 $\alpha$	<a href="#">LMFA03010001</a>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	370.2355	
<b>6,9<math>\alpha</math>-epoxy-11<math>\alpha</math>,15S-dihydroxy-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid, monosodium salt</b>	PGI <sub>2</sub>	<a href="#">LMFA03010087</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352.2250	
<b>9S,11,15S-trihydroxy-thrombox-13E-enoic acid</b>	TXB <sub>1</sub>	<a href="#">LMFA03030008</a>	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	372.2512	
<b>9S,11,15S-trihydroxy-thromboxa-5Z,13E-dien-1-oic acid</b>	TXB <sub>2</sub>	<a href="#">LMFA03030002</a>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	370.2355	

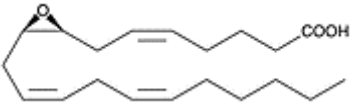
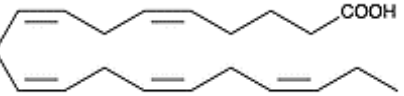

<b>9-oxo-11R,15S-dihydroxy-5Z,13E,17Z-prostatrienoic acid</b>	PGE3	<a href="#">LMFA03010135</a>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	350.2093	
<b>9S,11R,15S-trihydroxy-5Z,13E-prostadienoic acid</b>	PGF2 $\alpha$	<a href="#">LMFA03010002</a>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	354.2406	
<b>9-oxo-11R,15S-dihydroxy-5Z,13E-prostadienoic acid</b>	PGE2	<a href="#">LMFA03010003</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352.225	
<b>9S,15S-dihydroxy-11-oxo-5Z,13E-prostadienoic acid</b>	PGD2	<a href="#">LMFA03010004</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352.225	

<b>5S,6R,15S-trihydroxy-7E,9E,11Z,13E-eicosatetraenoic acid</b>	LXA4	<a href="#">LMFA03040001</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352.225	
<b>5S-hydroxy-6R-(S-cysteinylglycyl)-7E,9E,11E,14Z-eicosatetraenoic acid</b>	LTD4	<a href="#">LMFA03020006</a>	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	496.2607	
<b>5S,12R-dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraenoic acid</b>	LTB4	<a href="#">LMFA03020001</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	336.2301	
<b>(+/-)-14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Z,17Z-eicosatetraenoic acid</b>	14,15-DiHETE	<a href="#">LMFA03060077</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	336.2301	
<b>5S,6R-dihydroxy-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid</b>	5S,6R-DiHETE	<a href="#">LMFA03060017</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	336.2301	



<b>(+/-)-5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid</b>	5-HEPE	<a href="#">LMFA03070027</a>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	318.2195	
<b>9-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid</b>	9-HODE	<a href="#">LMFA02000151</a>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	296.2351	
<b>(±)20-hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,18E-docosahexaenoic acid</b>	20-HDHA	Item Cayman : 33750	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	344.2351	
<b>15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid</b>	15-HETE	<a href="#">LMFA03060087</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	
<b>11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraenoic acid</b>	11-HETE	<a href="#">LMFA03060085</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	

<b>8-hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid</b>	8-HETE	<a href="#">LMFA03060086</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	
<b>12-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid</b>	12-HETE	<a href="#">LMFA03060088</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	
<b>5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid</b>	5-HETE	<a href="#">LMFA03060084</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	
<b>14,15-epoxy-5Z,8Z,11Z-eicosatrienoic acid</b>	14,15-EET	<a href="#">LMFA03080005</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	
<b>9α,11α-methylene-15S-hydroxy-11a-deoxy-11a-methylene-thromba-5Z,13E-dien-1-oic acid</b>	CTA2	Item Cayman : 19010	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	348.5	

<b>8,9-epoxy-5Z,11Z,14Z- eicosatrienoic acid</b>	8,9-EET	<a href="#">LMFA03080003</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	
<b>5Z,8Z,11Z,14Z,17Z- eicosapentaenoic acid</b>	EPA	<a href="#">LMFA01030759</a>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	302.2246	
<b>5Z,8Z,11Z,14Z- eicosatetraenoic acid</b>	AA	<a href="#">LMFA01030001</a>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	304.2402	

## 1.2. Les phases stationnaires

Sept phases stationnaires différentes de par leur chimie ont été testées. Les phases Accucore™ C30, Accucore™ C18, Accucore™ C18 Polar Premium et Hypersil Gold™ C18 ont été fournies par Thermo Scientific Thermo Fisher Scientific (Langerwehe, Germany). La phase Cortecs Shield C18 nous a été fournie par Waters (Milford, PA, USA). Les phases Zorbax Bonus RP et Nucleodur ISIS C18 proviennent respectivement de Agilent (Little Fall, NJ, USA) et Machery Nagel (Düren, Germany). Les caractéristiques de toutes les phases sont répertoriées dans le **tableau 9**. Au total sept phases stationnaires à polarité de phases inversée dont trois (03) avec groupement polaire intégré (GPI) ont été utilisées dans le cadre de cette étude. Parmi les 7 phases, quatre sont des phases de type core shell (Accucore™ C30, Accucore™ C18, Accucore™ Polar Premium, Cortecs Shield C18).

**Tableau 9: les caractéristiques des 7 phases stationnaires utilisées pour le développement en RP-HPLC**

<i>Supplier</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i>	<i>Waters</i>	<i>Agilent</i>	<i>Machery Nagel</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i>
<b>Columns</b>	<i>Partially porous silica</i>				<i>Fully porous silica</i>		
	Accucore™ C30	Accucore™ C18	Accucore™ C18 Polar	Cortecs Shield RP 18	Zorbax BONUS-RP	Nucleodur C18 Isis	Hypersil Gold™ C18
<b>Packing Material</b>	Solid core particle. C30	Solid core particle. C18	Solid core particle. C18. Embedded amide group	Solid core particle. C18. Embedded carbamate group	Bonus-RP with an embedded amide linkage in the C14-alkyl chain	C18. Ultrapure Silica	C18. Ultrapure Silica
<b>Pore size (Å)</b>	150	80	150	90	80	110	175
<b>Particule size (µm)</b>	2.6	2.6	2.6	1.6	3.5	1.8	3
<b>Inner diameter (mm)</b>	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.0	2.1
<b>Length (mm)</b>	100	100	100	100	50	50	50
<b>Surface area (m<sup>2</sup>/g)</b>	90	130	90	100	180	340	220
<b>Carbone load (%)</b>	5	9	9	6.4	9.5	20	11
<b>End capped</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Triple	Yes	Yes

**Tableau 10: Les valeurs de sélectivité prédite suivant le modèle de soustraction hydrophobe pour chaque phase stationnaire**

<b>Name</b>	<b>Silica type</b>	<b>H</b>	<b>S*</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C (pH 2.8)</b>	<b>C (pH 7.0)</b>
<b>Accucore C30</b>	B	0.978	-0.02	-0.143	-0.002	0.321	0.462
<b>Accucore C18</b>	B	1.09	0.054	0.055	-0.04	0.072	0.095
<b>Accucore Polar Premium</b>	EP	0.871	0.103	-0.567	0.217	-0.207	0.787
<b>Cortecs UPLC Shield RP18</b>	EP	0.869	-0.023	-0.28	0.1	-0.19	0.096
<b>Zorbax Bonus RP</b>	EP	0.65	0.1	-1.04	0.37	-2.97	-1.1
<b>Nucleodur Isis</b>	B	1.02	0.05	-0.07	-0.02	-0.01	0.15
<b>Hypersil GOLD™ C18</b>	B	0.88	0	-0.01	0.03	0.16	0.47

### 1.3. Préparation des échantillons

Dès réception, tous les standards sont évaporés sous flux d'azote et repris dans un volume équivalent de méthanol pour obtenir une concentration de 50 µg/mL. Ils sont ensuite stockés à - 80 °C. Un mélange 1 d'AGPI (acide eicosapentaénoïque, acide palmitique, acide linoléique, acide arachidonique et acide oléique) à 50 µg/mL est préparé pour des évaluations préliminaires de performances des différentes colonnes en mode isocratique. Ensuite, un mélange 2 comprenant l'ensemble des eicosanoïdes commandés et les précurseurs, est préparé par évaporation et resolubilisation dans du méthanol pour avoir la concentration souhaitée (50 µg/mL). Le mélange 2 a servi au développement de la méthode de séparation en RP-HPLC.

## 2. Méthodes : conditions chromatographiques

Les échantillons ont été analysés par un système de chromatographie liquide ultra haute performance (Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000) équipé d'un auto-échantillonneur, d'une pompe quaternaire de distribution de solvant avec un dégazeur intégré. Notre UHPLC était couplée à un détecteur d'aérosols chargés corona CAD® avec les paramètres suivants : pression du gaz (Azote), 35 Psi; total flow, 1.53; flow ratio, 0.39; température de l'électromètre = 35 °C; tension du corona, 2.34 kV; Icor, 1.00Ua; IonT, 20.4 V; gamme, 100 pA. Le Corona CAD® était couplé à un générateur d'azote (Esa Nitrogen generator, Model N2-4000-L1252). Sur la base du modèle de soustraction hydrophobe, sept phases stationnaires différentes en termes de sélectivité prédite ont été sélectionnées puis comparées par différents descripteurs de performances chromatographiques tels que la sélectivité, le facteur de rétention, l'efficacité, le « time needed » et la capacité de pic. Pour cela, toutes les colonnes ont d'abord été évaluées en mode isocratique (avec débit de 0,5 mL/min avec une phase mobile acétonitrile-eau (70 :30, v/v) contenant 0,04% d'acide formique) à partir d'un mélange d'AGPI à 50µg/mL. Ensuite, un gradient linéaire (**Annexe I.1 et I.3**) et un gradient optimisé suivi d'une phase mobile optimisée (**Annexe I.2 et I.3**) ont permis de comparer les performances des phases stationnaires. Enfin une étude de l'influence du pH, de la température et du MeOH sur la séparation des eicosanoïdes a été réalisée sur la phase stationnaire sélectionnée.

## II. Résultats et Discussion

En chromatographie liquide, sélectionner la phase stationnaire appropriée parmi les plus de 751 disponibles commercialement constitue un défi d'autant plus difficile à relever que le mélange à séparer est complexe. Un tour d'horizon sur le panel de méthodes déjà développées en littérature permet de se rendre compte que même si ces méthodes semblent relativement rapides, plusieurs espèces d'eicosanoïdes sont co-éluées, notamment les acides hydroxyeicosatétraénoïques, les acides epoxyeicosatétraénoïques, et parfois les prostaglandines [39,82]. La littérature propose de nombreux tests dédiés à la caractérisation des phases stationnaires pouvant guider le chromatographe pour le choix de la phase stationnaire. Cependant, ces tests ne font pas l'unanimité au sein de la communauté scientifique.

Les phases les plus utilisées pour l'analyse des eicosanoïdes sont celles à chimie de greffage C18 et avec groupement polaire intégrés [39,51,116]. La diversité de phases stationnaires complique le choix de phases à sélectionner dans le cadre d'un développement. Il faut donc une stratégie de choix rationnel de phases stationnaires en tenant compte de l'étude à réaliser. Dans notre étude, au total sept phases stationnaires dont quatre de type core shell à savoir Cortecs Shield, Accucore Polar Premium, Accucore C18 et Accucore C30 ont été testés. La polarité relativement diversifiée des eicosanoïdes nous a poussé à inclure trois colonnes avec GPI car ces GPI présenteraient des interactions polaires intéressantes qui peuvent aider à leur séparation. Aussi, la chaîne carbonée des eicosanoïdes nous a orienté vers le test de colonnes à greffage C18 et de phases avec un greffage à chaîne plus longue tel que C30. Le modèle de soustraction hydrophobe (HSM) a ensuite été utilisé pour comparer les sept phases stationnaires sélectionnées.

### 1. Le modèle de soustraction hydrophobe (HSM) pour le choix des phases stationnaires

Les modèles de sélection de colonnes allant de celui d'Engelhardt en passant par Tanaka jusqu'à Dolan [198] utilisent des composés de référence qui représentent une interaction donnée pour déduire une sélectivité donnée. Les composés de référence dans les systèmes de sélection de colonnes, sont volatils et ne peuvent pas être détectés par Corona CAD® sur lequel est conduit notre développement. Pour toutes ces raisons, la comparaison de la sélectivité prédite des colonnes à travers la plupart des CSS pour la séparation des eicosanoïdes n'est pas possible. Le modèle HSM utilisé dans ce travail, a été décrit pour le choix de phases stationnaires de

sélectivité différente ou pour sélectionner des colonnes de remplacement qui donneront la même séparation [258]. Du fait de la ressemblance structurale et la faible diversité des interactions des eicosanoïdes en RP-HPLC, le modèle HSM a été utilisé dans ce travail pour choisir sept phases stationnaires de sélectivité différente.

Le **tableau 10** montre les valeurs de sélectivité prédite (H, S\*, A, B, C) [197] permettant de calculer le paramètre de sélectivité  $F_s$  [258,259] pour chaque phase stationnaire suivant le modèle HSM. L'interaction d'échange de cation à pH 7 n'a pas été prise en compte dans notre développement étant donné que notre phase mobile A était tamponnée à pH 3. Le facteur  $F_s$  suivant l'**équation 43** se définit comme une distance euclidienne entre deux colonnes dans un espace à 5 dimensions prenant en compte chaque interaction du HSM (H, S\*, A, B, C). Chaque sélectivité ou interaction ne contribue pas suivant la même importance à la résultante finale du  $F_s$ . En conséquence, il est courant d'utiliser des facteurs poids qui ne sont que le reflet de la différence de contribution de chaque interaction à la sélectivité globale qui en résulte. Il faut préciser aussi que cette contribution est fonction de la structure des molécules à séparer et aussi principalement des interactions de type liaison hydrogène basique (B) et de type échange de cation (C). A l'exception des peptido-leucotriènes dont l'ionisation peut varier drastiquement en fonction du pH, l'ionisation des eicosanoïdes est très peu influencée par le pH. Nous avons choisi le poids par défaut de chaque interaction pour le calcul de  $F_s$ . Les valeurs par défaut 12.5, 100, 30, 143 et 83 respectivement pour H, S\*, A, B, C représentent la différence d'hydrophobicité, d'interactions stériques, d'acidité des liaisons hydrogène, basicité des liaisons hydrogène et interaction d'échange de cation.

$$F_s = \sqrt{(12.5(H_1 - H_2))^2 + (100(S_1^* - S_2^*))^2 + (30(A_1 - A_2))^2 + (143(B_1 - B_2))^2 + (83(C_{2.81} - C_{2.82}))^2}$$

### Equation 43

En règle générale, une valeur de  $F_s$  inférieure à 3 implique des colonnes de sélectivité similaire tandis qu'une valeur de  $F_s$  supérieure à 3 indique des colonnes de sélectivité différente. Les valeurs de  $F_s$  calculé sont répertoriées dans le **tableau 11**. Suivant le **tableau 11**, les deux Accucore™ C18 et C30 sont proches, et similaires à Hypersil Gold™ C18. Hypersil Gold™ C18 étant proche de Nucleodur, on s'attendrait à ce que Nucleodur Isis soit similaire à Accucore™ C30 : ce qui n'est pas le cas puisque le  $F_s$  entre les deux est de 4.90. Les phases avec GPI se distinguent par des  $F_s$  très élevés vis-à-vis des 4 phases précédentes en particulier. La Zorbax bonus, une C14 avec groupement amide, est très différente de toutes les autres phases



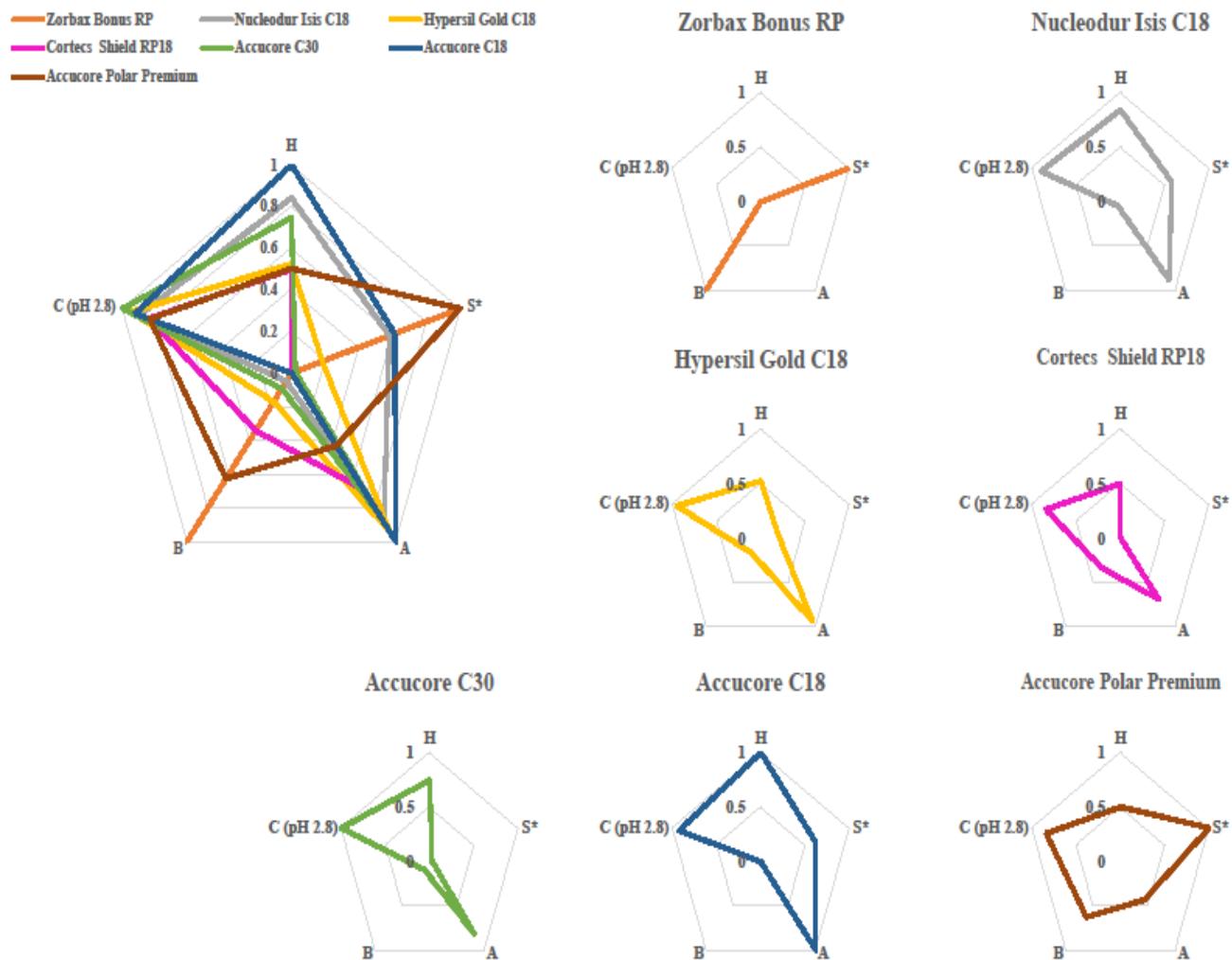
y compris des deux autres avec GPI. La Cortecs Shield RP18 et l'Accucore™ Polar Premium seraient relativement proches l'une de l'autre avec un  $F_s=3.02$ . Le facteur  $F_s$  étant le reflet de la position de deux colonnes l'un par rapport à l'autre dans un espace à 5 dimensions, il est possible qu'une valeur élevée d'une interaction donnée d'une phase stationnaire conduise à une visualisation biaisée loin de la sélectivité réellement induite. Par exemple, suivant ce facteur, la phase Accucore™ C18 et Nucleodur Isis donnerait des séparations équivalentes, idem entre Accucore™ C30 et Hypersil Gold™ C18.

**Tableau 11: Paramètre  $F_s$  calculé pour l'ensemble des sept colonnes testées deux à deux**

<b>Manufacturer</b>	<b>Stationary phases</b>	<i>Accucore C30</i>	<i>Accucore C18</i>	<i>Accucore Polar</i>	<i>Cortecs Shield RP18</i>	<i>Zorbax Bonus RP</i>	<i>Nucleodur Isis C18</i>	<i>Hypersil GOLD™ C18</i>
<b>Thermo/Hypersil</b>	<i>Accucore C30</i>	0						
<b>Thermo/Hypersil</b>	<i>Accucore C18</i>	<b>3.61</b>	0					
<b>Thermo/Hypersil</b>	<i>Accucore Polar</i>	18.52	14.1	0				
<b>Waters</b>	<i>Cortecs Shield RP18</i>	11.93	6.53	<b>3.02</b>	0			
<b>Agilent</b>	<i>Zorbax Bonus RP</i>	472.82	415.35	322.15	335.66	0		
<b>Macherey Nagel</b>	<i>Nucleodur Isis C18</i>	4.90	<b>0.57</b>	9.61	<b>3.44</b>	389.57	0	
<b>Thermo/Hypersil</b>	<i>Hypersil GOLD™ C18</i>	<b>1.49</b>	<b>1.15</b>	13.27	6.55	431.58	<b>1.67</b>	0

Les valeurs de  $F_s$  ont été calculées à partir des valeurs de sélectivités prédites du **tableau 10** extraites de la base de donnée HPLC [197].

Afin d'évaluer la contribution de chaque type de sélectivité (H, S\*, A, B, C) à la sélectivité globale prédite pour chaque phase stationnaire, nous avons réalisé une représentation en radar plot (**Fig.28**) des valeurs de sélectivité pour chaque colonne suivant le modèle HSM. L'analyse des radar plots combinés (**Fig.28**) permet de se rendre compte que les phases avec GPI sont non seulement moins hydrophobes mais aussi susceptibles d'induire une faible résistance stérique à la pénétration dans les greffons. Les phases avec GPI de type amide (Accucore™ Polar Premium et Zorbax Bonus RP) se distinguent par une interaction de type liaison hydrogène basique plus importante que celle avec carbamate (Cortecs Shield RP18). En effet, le GPI de type amide est plus basique qu'un carbamate [204]. Ces deux phases qui induisent la plus forte basicité, sont prédisposées à opposer la plus grande résistance à la pénétration des solutés dans les greffons. Contrairement au facteur  $F_s$ , l'analyse d'un radar plot combiné de l'ensemble des sept phases stationnaires montre que les phases stationnaires Accucore™ C18 et Nucleodur Isis peuvent être différenciées en termes de comportement chromatographique par leur hydrophobicité et leur aptitude à induire des liaisons hydrogènes (la phase Accucore™ C18 prenant le dessus dans les deux types d'interactions). Hormis la sélectivité liée à l'échange de cation, Accucore™ C30 et Hypersil Gold™ C18 suivant le radar plot donneraient des séparations différentes. Nous montrons donc ici les limites du facteur  $F_s$  en ce qui concerne son utilisation pour le choix de phases stationnaires équivalentes puisque certaines conclusions faites sur sa base sont nuancées par les radar plots. Enfin, l'ensemble des radar plots pris isolément (**Fig.28**) montre l'hétérogénéité en termes de sélectivité de nos sept phases stationnaires.



**Figure 28: Représentation des sélectivités prédites suivant le modèle de soustraction hydrophobe pour les sept phases stationnaires sous forme de radar plots.**

H, hydrophobicité ; S\*, sélectivité stérique ; A, Liaisons hydrogène acides ; B, Liaisons hydrogènes basiques ; C, le degré d'ionisation du silanol ou interaction d'échange de cations. Toutes les valeurs pour chaque colonne suivant {Citation} sont normalisées à la valeur la plus élevée.

## **2. Choix des eicosanoïdes dans le contexte « athérosclérose »**

Tous les eicosanoïdes choisis sont directement en rapport avec la pathogenèse de l'athérosclérose. De plus, les oxylipines incluses dans cette étude permettent d'explorer les problématiques liées à la séparation des isomères et isobares d'eicosanoïdes. Chaque sous-famille des eicosanoïdes et leurs membres sont structurellement distincts et présentent des actions stéréospécifiques et des mécanismes biosynthétiques spécifiques. Au total 26 molécules ont été incluses dans notre mélange complexe 2 (tel que défini dans la partie matériel et méthodes) pour l'optimisation de la séparation en RP-HPLC. A titre d'exemple, la PGE2 et la PGD2 d'une part, la 14,15-DiHETE et la 5,6-DiHETE d'autre part, sont des isomères et isobares d'eicosanoïdes. La PGE2 et la PGD2 partagent le même profil MS/MS après fragmentation, compliquant donc leur dosage sans séparation préalable en RP-HPLC. Vu que des processus de chimiotactisme ont lieu au cours du développement de la plaque d'athérome, nous avons inclus des eicosanoïdes comme les HETEs jouant ce rôle. Certaines molécules choisies ont des effets opposés. La PGF2 $\alpha$  agit comme vasoconstricteur tandis que la PGI2 est un vasodilatateur par relaxation des cellules musculaires lisses, mais aussi par inhibition de l'agrégation plaquettaire et inhibition de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales. La demi-vie très courte de la PGI2 dans les échantillons cellulaires [247,260] nous oblige à inclure son produit d'hydrolyse la 6-Céto PGF1 $\alpha$ . La dégradation de la PGI2 en 6-Céto PGF1 $\alpha$  a été constatée au cours de notre développement et était difficilement gérable malgré la conservation à -80°C. En revanche, nous ne nous sommes pas penchés sur la cinétique de dégradation à partir du moment où nous pouvons par extrapolation dire que la 6-Céto PGF1 $\alpha$  est possiblement un marqueur de la présence de la PGI2. Deux précurseurs des eicosanoïdes à savoir l'AA et l'EPA nous aideront à mieux comprendre les possibles variations de nos molécules dans les échantillons cellulaires.

## **3. Comparaison des performances chromatographiques de sept phases stationnaires en mode isocratique**

### **3.1. Analyse du profil de séparation du mélange 1 sur les sept phases stationnaires.**

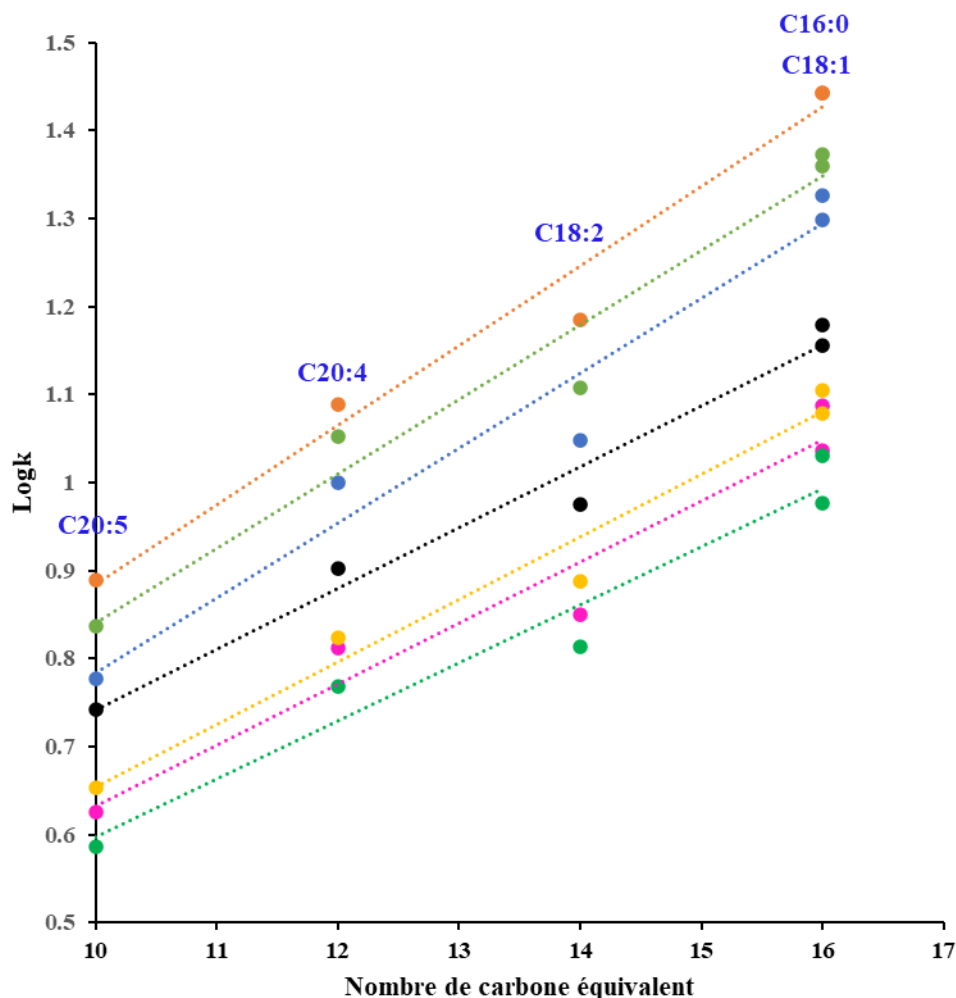
Notre mélange 1 était composé de l'acide arachidonique (C20 :4), l'acide eicosapentaénoïque (C20 :5), l'acide linoléique (C18 :2), l'acide palmitique (C16 :0) et de l'acide oléique (C18 :1). Le calcul du nombre de carbone équivalent des 5 molécules [261,262] donne respectivement 10-12-14-16-16. Globalement, on s'attendrait donc à une co-élution ou une faible résolution de séparation entre l'acide palmitique et l'acide oléique.

Une analyse rapide des profils de séparation d'AGPI sur les 7 phases stationnaires (**Annexe I.4**) permet de se rendre compte que seules les colonnes Accucore™ C18, Accucore™ C30, Cortecs Shield C18 et Hypersil Gold™C18 séparent les 5 composés avec une résolution supérieure à 1,5. On note une co-élution des deux derniers composés (C 16:0 - C 18:1) pour Accucore™ Polar premium. Sachant que nous sommes dans des conditions acides de phase mobile, cette co-élution serait probablement due à des interactions secondaires de type liaison hydrogène entre les analytes et les groupements polaires intégrés de type amide.

### **3.2. Evaluation du facteur de rétention des phases stationnaires en mode isocratique**

La **Figure 29** illustre les logarithmes des facteurs de rétention pour chaque AGPI évalué en mode isocratique sur les sept phases stationnaires. Cette première analyse permet de catégoriser nos phases en deux groupes : les plus rétentives dont Accucore™ Polar Premium et Nucleodur ISIS, et les moins rétentives telles que Accucore™ C30 et Hypersil Gold™C18. Globalement, la colonne Accucore™ C30 est la moins rétentive parmi les colonnes core shell avec le plus faible pourcentage de carbone de l'ordre de 5%. Cette rétention semble corrélée avec le pourcentage de greffage. Le faible taux de greffage d'Accucore™ C30 serait probablement dû à l'encombrement stérique pour un greffage à chaîne longue (C30). En revanche en termes de surface spécifique, on remarque que l'Accucore™ Polar Premium ayant une surface spécifique de 90 m<sup>2</sup>/g nettement inférieure à l'Hypersil Gold™C18 se retrouve plus rétentive. Ceci serait dû à la présence de GPI responsables d'interactions polaires secondaires. Aussi, la rétention de nos phases stationnaires semble corrélée au pourcentage de carbone à l'exception de Accucore™ Polar Premium et Hypersil Gold™ C18. De l'analyse de toutes ces données, il paraît clair que la rétention de nos phases stationnaires ne semble pas lier uniquement à la surface spécifique. En effet, plusieurs paramètres liés à la chimie de greffage, à la silice de base, et aux caractéristiques des particules interviennent pour expliquer les performances de rétention différenciées des colonnes. On remarque également que le Logk en fonction du nombre de carbone équivalent ne semble pas très linéaire pour nos phases stationnaires. En effet, les facteurs impliqués dans la rétention de molécules lipidiques sont multiples. Mise à part la présence ou non de GPI et de chimie de greffage qui sont source de rétention, la position et le nombre d'insaturations dans les AGPI influencent la rétention. Il est bien établi que le logarithme de la rétention est directement lié à la surface de contact des solutés avec la phase stationnaire [263]. Du fait de la dérivation quasi identique du Logk de l'acide linoléique par rapport à la pente de chaque phase stationnaire, l'on pourrait penser que l'acide linoléique a une

interaction moléculaire différente vis-à-vis des phases stationnaires par rapport aux autres solutés. Les deux insaturations dans la molécule lui impliqueraient donc une géométrie spatiale particulière lorsqu'elle interagit avec les greffons des phases.



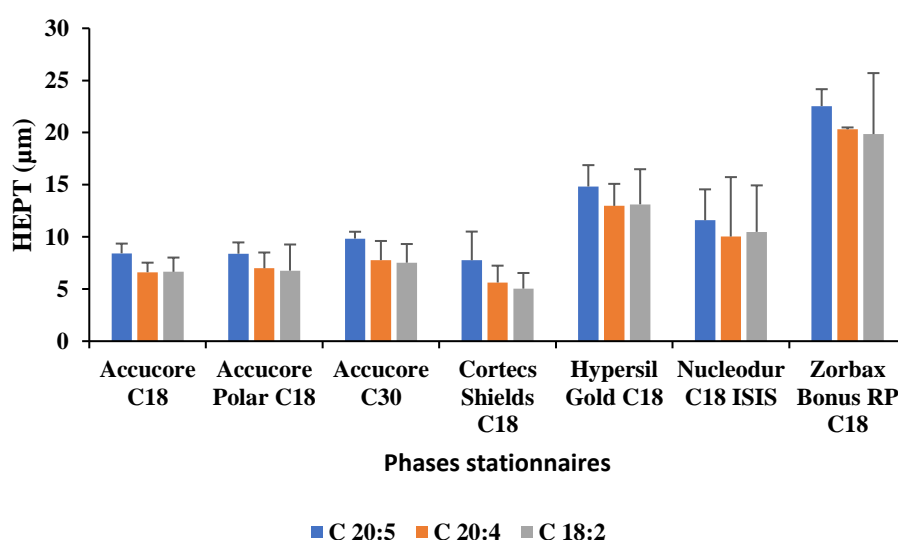
**Figure 29: Evaluation de la rétention des sept phases stationnaires en mode isocratique.** Les performances de rétention ont été évaluées à partir du mélange 1 composé de 5 AGPI (C 20:5 ; C 20:4 ; C 18:2 ; C 16:0 ; C 18:1). Phase mobile: (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH. Débit = 0.5 mL/min ; T = 30°C ; Concentration du mélange = 50µg/ mL ; Vinj = 1µL. En orange : Accucore™ Polar Premium, en vert clair : Nucleodur Isis C18, en bleu : Accucore™ C18, en noir : Zorbax Bonus RP, en or : Cortecs Shield RP18, en rose : Accucore™ C30, en vert : Hypersil Gold™ C18.

### 3.3. Evaluation de l'efficacité des phases stationnaires

Le détecteur utilisé (Corona® CAD) ne possède pas un profil de réponse linéaire contrairement au détecteur UV par exemple. Le signal obtenu n'est donc pas le reflet exact du profil de

concentration de l'analyte sous-jacent au tracé du pic chromatographique. Et donc, l'efficacité calculée ici correspond à une efficacité apparente.

La **figure 30** montre l'évaluation de la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) pour chaque colonne. Comme attendu, les colonnes de type core shell (Cortecs Shield C18 et Accucore™ C18, Polar premium et C30) montrent une meilleure efficacité apparente (avec environ 8  $\mu\text{m}$  en HEPT). Cette valeur semble normale au vu du fait que la HEPT d'une colonne est en théorie égale à 2 ou 3 fois le diamètre des particules. Toute valeur au-delà de cette plage laisse supposer que la colonne ne serait pas suffisamment efficace pour des applications de séparation de mélange complexe.



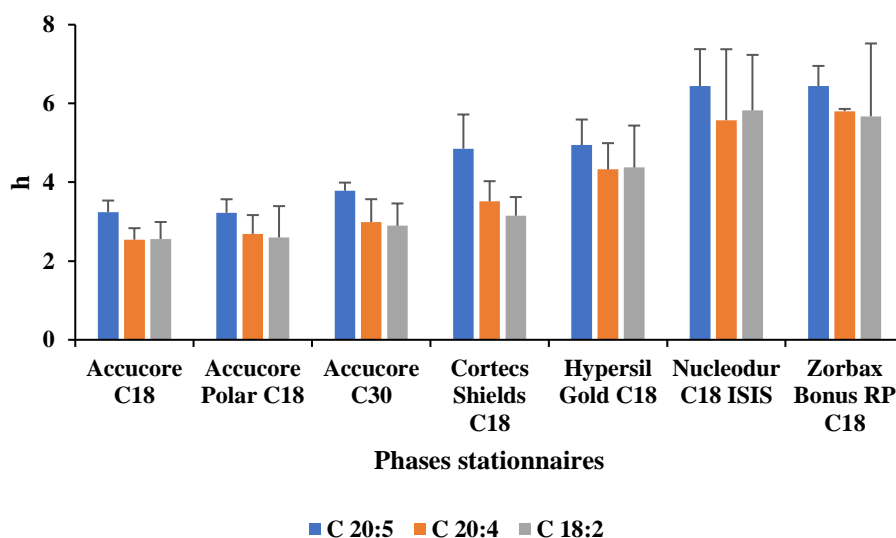
**Figure 30 : Evaluation de l'efficacité apparente de sept phases stationnaires en mode isocratique.**

Phase mobile : A (Eau : ACN, 70:30, v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH ; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; Vinj = 1 $\mu\text{L}$ . Les résultats sont exprimés en moyennes de HEPT  $\pm$  coefficient de variation, n=10. Les coefficients de variation sont matérialisés par les barres d'erreurs.

Le paramètre h a ensuite été calculé pour faire abstraction de l'influence du diamètre des particules constituant les 7 colonnes afin de comparer leur performance entre elles. En pratique, des valeurs de h plus élevées, par exemple supérieures à 3 [195], sont l'indice d'un mauvais remplissage de la colonne ou d'une répartition granulométrique trop large des particules du support. La **figure 31** montre l'évaluation de l'efficacité intrinsèque des phases. Les phases stationnaires de type Core shell semblent offrir une meilleure efficacité intrinsèque par rapport aux autres colonnes classiques. Ces résultats confirment les données de la littérature et s'expliquent en partie par le fait que le terme A de Van Deemter [180] et la vitesse linéaire de la phase mobile sont réduites dans les phases stationnaires de type core shell, ce qui permet



d'avoir une efficacité maximale [182]. Aussi, les colonnes Accucore™ ont entre elles une efficacité intrinsèque apparente comparable. Même si les données en ce qui concerne les dimensions des « shell : couche poreuse » ne sont pas disponibles, il est très probable que les dimensions de nos trois phases Accucore™ soient proches, ce qui expliquerait leur proximité en termes d'efficacité apparente intrinsèque.

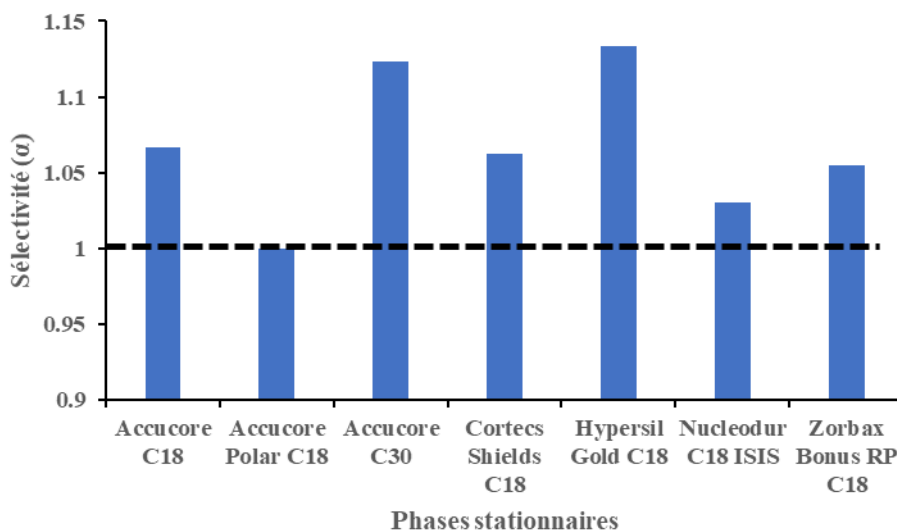


**Figure 31 : Evaluation de l'efficacité apparente intrinsèque de sept phases stationnaires en mode isocratique.**

Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50µg/ mL ; Vinj = 1µL. Les résultats sont exprimés en moyennes de HEPT ± coefficient de variation, n=10. Les coefficients de variation sont matérialisés par les barres d'erreurs.

### 3.4. Evaluation de la sélectivité des sept phases stationnaires en mode isocratique

L'acide palmitique et l'acide oléique ont été choisis pour l'évaluation de la sélectivité des 7 phases stationnaires en mode isocratique. La **figure 32** montre que toutes les phases stationnaires séparent très bien les deux AGPI avec une sélectivité supérieure à 1.1 à l'exception d'Accucore™ Polar Premium.



**Figure 32: Evaluation de la sélectivité des sept phases stationnaires en mode isocratique.**

Le mélange 1 composé des 5 AGPI est celui analysé mais la sélectivité a été calculé ici entre l'acide palmitique et l'acide oléique. Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50 $\mu$ g/ mL ;  $V_{inj}$  = 1 $\mu$ L.

## 4. Comparaison des performances chromatographiques de phases stationnaires à polarité de phases inversée en mode gradient

Afin de mieux comparer les 7 phases stationnaires pour l'analyse des eicosanoïdes, deux approches ont été utilisées : l'évaluation en mode gradient linéaire et en mode gradient optimisé. La nécessité de procéder à une comparaison via ces deux gradients se justifie par l'hétérogénéité de greffage, de chimie et les procédures de fabrications spécifiques selon les fournisseurs. En effet, les bandes de compression des pics ne sont pas similaires en fonction des pentes de gradient spécifique développé pour chaque phase stationnaire et oblige donc à explorer aussi le mode gradient linéaire. Les gradients d'éluion sont largement étudiés dans la littérature [264].

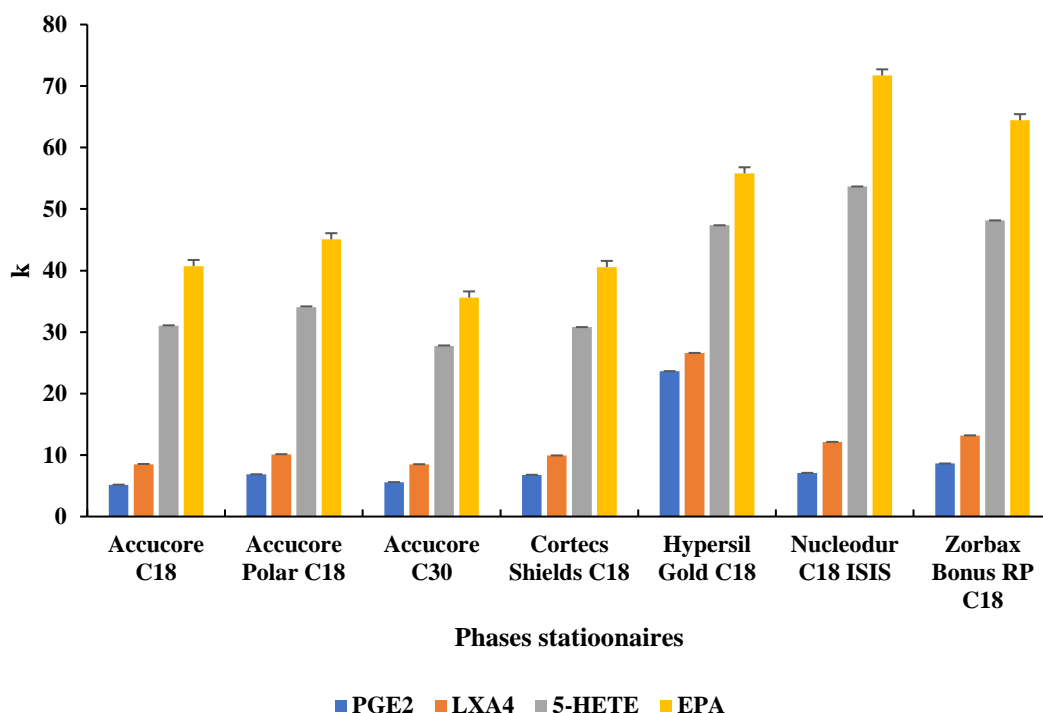
### 4.1. Evaluation des capacités de rétention des phases stationnaires

Nous avons choisi d'évaluer la rétention des phases stationnaires en compilant les données de facteurs de rétention moyens de 4 eicosanoïdes : PGE2, LXA4, 5-HETE, EPA. Ces 4 molécules sont représentatives de l'ensemble du profil chromatographique des eicosanoïdes étudiés dans ce travail.

#### 4.1.1. Analyse en mode gradient linéaire

La **figure 33** illustre l'évaluation des facteurs de rétention moyen des phases stationnaires en mode gradient linéaire. La phase Nucleodur C18 ISIS et Zorbax Bonus RP s'avèrent les plus

rétentives. Ce résultat semble corrélé avec son pourcentage de greffage en carbone (20%) par rapport aux autres colonnes dont la teneur en carbone varie entre 5% et 11%. On remarque également que la phase Hypersil Gold™ C18 d'une part et les phases Cortecs Shield C18 et Accucore™ C18 Polar d'autre part ont des performances de rétention comparables. Ces valeurs de k comparables entre Cortecs Shield et Accucore™ Polar Premium seraient dues à la présence de GPI. Enfin, Accucore™ C30 avec un pourcentage de carbone le plus faible (5%) reste la moins rétentive.



**Figure 33: Moyenne des facteurs de rétention pour quatre eicosanoïdes pour chacune des sept phases stationnaires évaluées en gradient linéaire**

Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50µg/ mL ; Vinj = 1µL. Les résultats sont exprimés en moyennes de  $k \pm$  écart type, n=3. Les écarts types sont matérialisés par les barres d'erreurs.

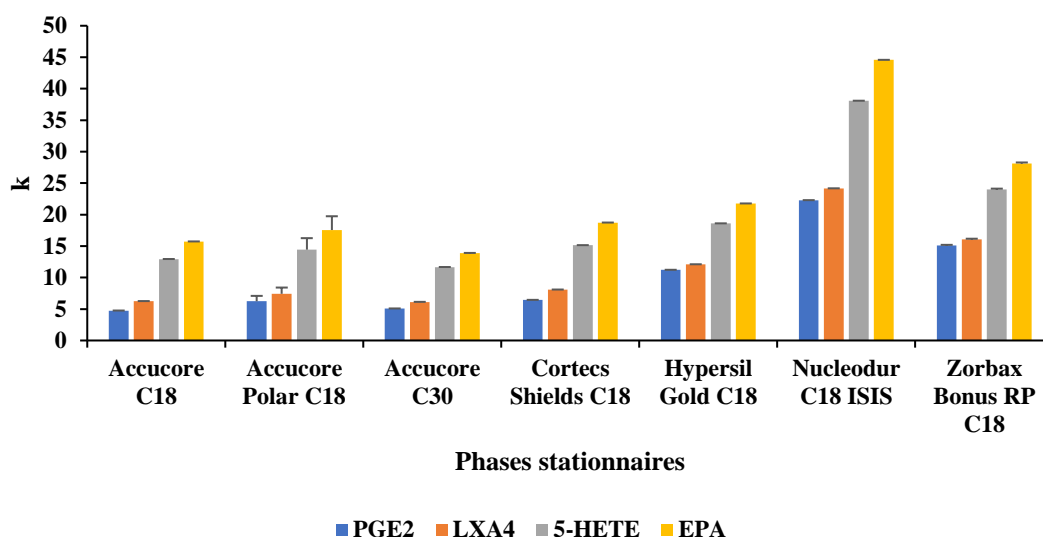
#### 4.1.2. Analyse en mode gradient optimisé

Les résultats de l'évaluation des sept phases stationnaires en mode gradient optimisé montrent une répartition des phases en deux groupes sur des critères de composition de la phase mobile : un premier groupe composé de phases type Core Shell et un deuxième groupe constitué de colonnes classiques (**Annexe I.3**).

L'évaluation des facteurs de rétention des colonnes de type core shell (**Fig.34**) montre que l'Accucore™ C30 est la moins rétentive et les colonnes core shell avec groupement polaire

intégré (Accucore™ C18 Polar et Cortecs Shield C18) ont en moyenne des facteurs de rétention comparables. Ces résultats confirment nos résultats expérimentaux que ce soit en mode analyse isocratique des AGPI ou en mode gradient linéaire.

L'analyse du deuxième groupe (phases stationnaires classiques) vient conforter elle aussi les résultats en mode isocratique comme en mode linéaire, la Nucleodur C18 ISIS demeure la plus rétentive. Zorbax Bonus RP avec un taux de carbone de 9,5% possède un facteur k relativement plus élevé que l'Hypersil Gold™ C18 qui a un %C de 11 %. Ceci s'expliquerait par la présence d'un GPI de type amide dans Zorbax Bonus RP. Enfin, le pourcentage de phase aqueuse de l'ordre de 85% approprié à l'élution des prostanoïdes avec des pics fins montre à quel point ces phases classiques sont plus rétentives par rapport aux phases Core Shell (70% phase aqueuse ; **Annexe I-3**).



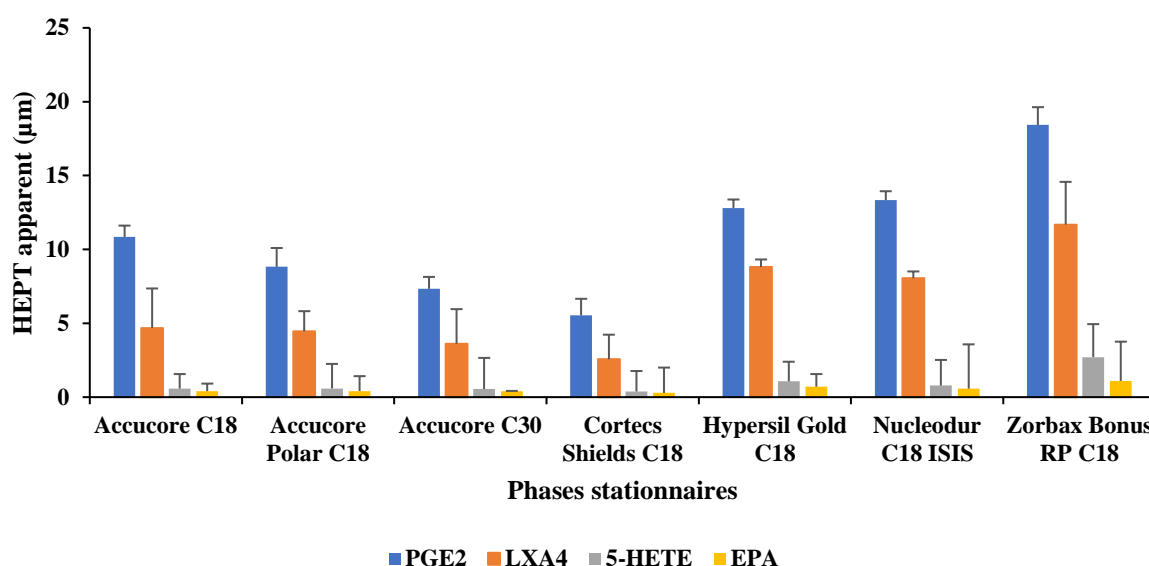
**Figure 34: Moyenne des facteurs de rétention pour quatre eicosanoïdes sur les SEPT phases stationnaires en mode gradient optimisé.**

Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; T = 25°C sauf pour Cortecs Shield C18 Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile :Isopropanol,70 :30,v) contenant 0,04%HCOOH et pour les colonnes classiques : Phase mobile: A (Eau:ACN, 85:15,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50µg/ mL ; Vinj = 1µL. Les résultats sont exprimés en moyennes de  $k \pm$  écart type, n=3. Les écarts types sont matérialisés par les barres d'erreurs.

#### 4.2. Evaluation de l'efficacité apparente des huit phases stationnaires en mode gradient linéaire

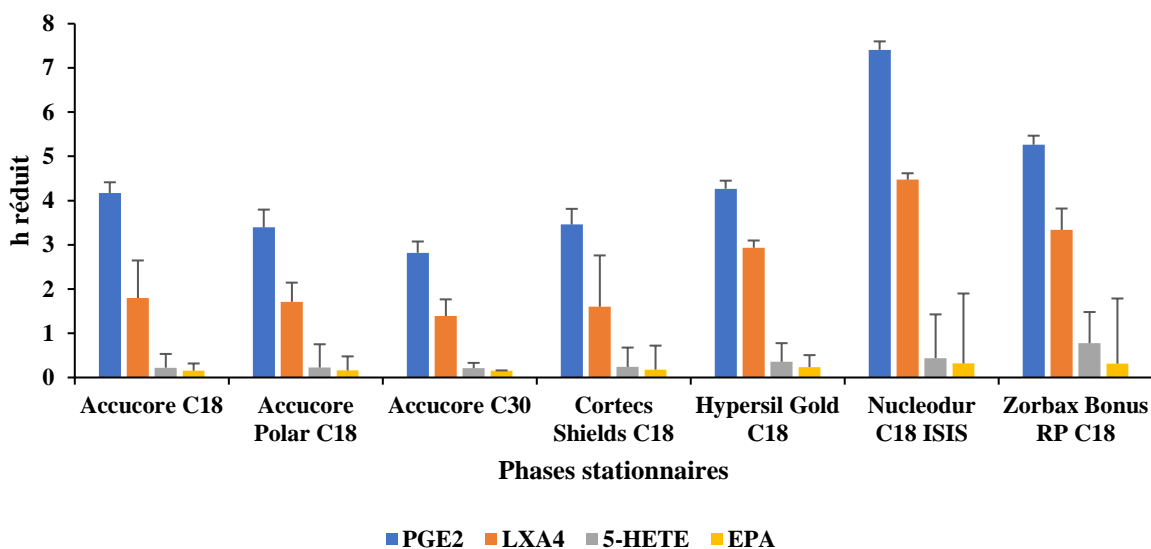
L'évaluation de l'efficacité apparente des phases stationnaires en mode gradient linéaire (**figure 35 et 36**) montre que les colonnes de type core shell semblent plus efficaces que les colonnes

classiques. Ces résultats confirment ceux attendus suivant la littérature [178]. Les colonnes Accucore™ C30 et Cortecs Shield RP18 se distinguent par une meilleure efficacité. La bonne performance des colonnes de type core shell résulte d'un terme B plus petit (en raison de la non porosité du noyau, ce qui donne un volume de lit compact réduit accessible à la diffusion) [91,92] et d'un terme A très réduit (compte tenu de l'homogénéité de remplissage mais aussi de la forme régulière des particules core shell préalablement constituées) [178,265,266]. Les phases Accucore™ C30 et Accucore™ Polar Premium partagent la même taille de pore (150) mais n'ont pas la même efficacité. Cette différence serait liée à des défauts de conditionnement se traduisant par un défaut d'homogénéité de remplissage des particules notamment sur les parois de la colonne [178]. A la différence des phases à particules partiellement poreuses, les phases stationnaires classiques se caractérisent par des particules totalement poreuses se soldant par un terme B plus grand et une résistance au transfert de masse plus importante aboutissant à des pics plus larges.



**Figure 35: Moyenne des hauteurs équivalentes à un plateau théorique (HEPT) pour sept phases stationnaires évaluées en mode gradient linéaire.**

Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50µg/ mL ; Vinj = 1µL. Les résultats sont exprimés en moyennes de HEPT ± coefficient de variation, n=3. Les coefficients de variation sont matérialisés par les barres d'erreurs.



**Figure 36: Moyenne des hauteurs équivalentes à un plateau théorique réduit (h) pour 7 phases stationnaires évaluées en mode gradient linéaire.**

Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH ; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50µg/ mL ; Vinj = 1µL. Les résultats sont exprimés en moyennes de  $h \pm$  coefficient de variation, n=3. Les coefficients de variation sont matérialisés par les barres d'erreurs.

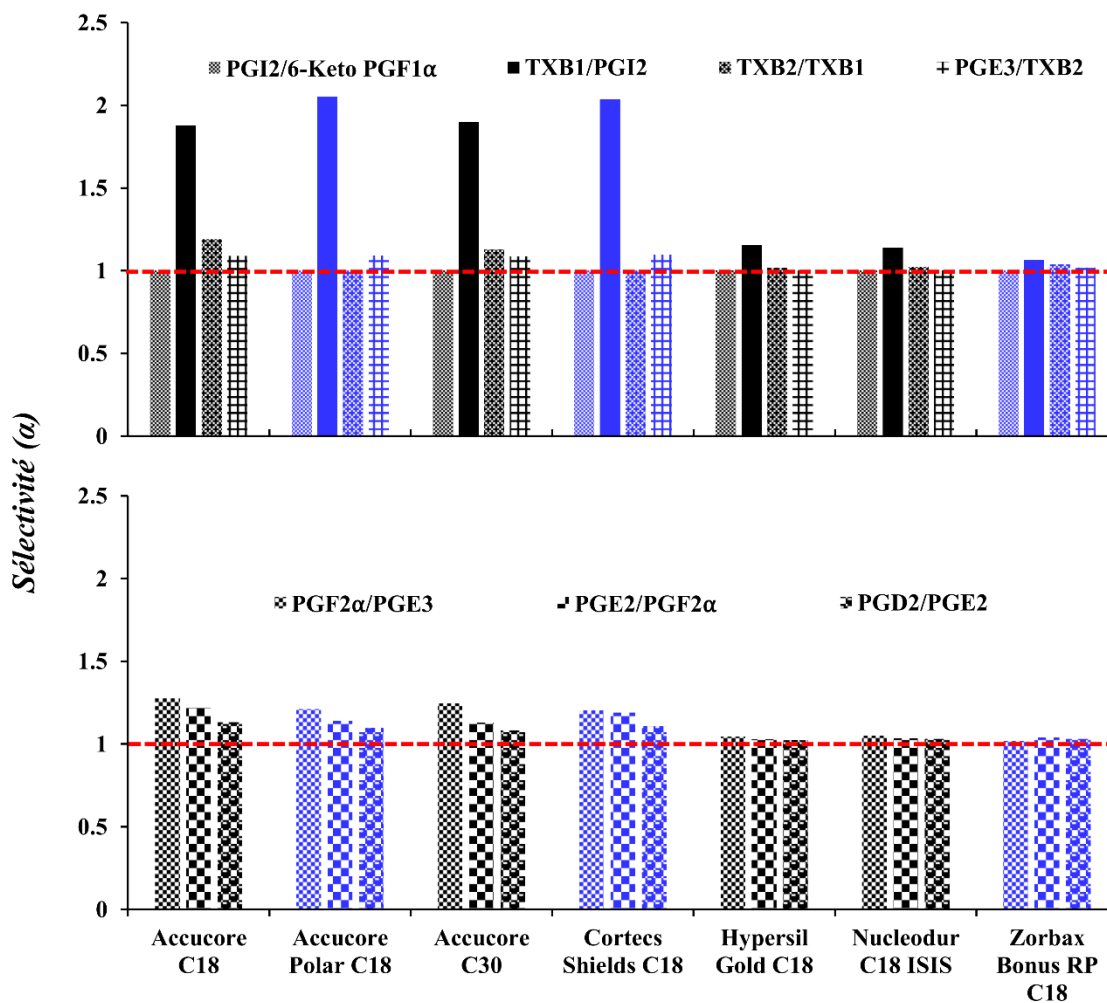
### 4.3. Comparaison des phases stationnaires par des critères d'optimisation de la sélectivité

La sélectivité dépend des facteurs de rétentions, qui eux-mêmes, sont intimement liés à la chimie de greffage. Notre choix de phase stationnaire appropriée à la séparation des eicosanoïdes est essentiellement basé ici sur des critères d'optimisation de la sélectivité. Ces critères d'optimisation de la sélectivité sont entre autres : la sélectivité, la capacité de pic ( $P_c$ ) et le time needed ( $T_{NE}$ ).

#### 4.3.1. L'évaluation de la sélectivité de séparation des eicosanoïdes

Sur la base de la chimie de nos phases stationnaires, celles-ci peuvent être regroupées en deux types de sélectivité à savoir une sélectivité stérique et une sélectivité fonctionnelle. Toutes nos phases stationnaires sont dotées d'une sélectivité stérique à différents degrés du fait de leur chimie de greffage différente. La phase Accucore™ C30 a une sélectivité méthylène plus importante du fait de sa longueur de chaîne. La sélectivité fonctionnelle caractérise beaucoup plus les phases stationnaires avec GPI comme Accucore™ Polar premium, Cortecs Shield RP18 et Zorbax bonus RP C18. Cette sélectivité fonctionnelle est le plus souvent mise à profit pour la rétention et la séparation de composés polaires à l'instar des prostanoides.

L'analyse de la sélectivité mesurée entre sept couples de prostanoides (**Fig.37**) pour chaque phase stationnaire en mode gradient linéaire permet de les catégoriser en deux groupes : d'une part les phases à particules partiellement poreuses (Accucore™ C18, Accucore™ Polar Premium, Accucore™ C30 et Cortex Shield RP18) et d'autre part celles à particules totalement poreuses (Hypersil Gold™ C18, Nucleodur Isis C18 et Zorbax Bonus RP C18). Cette catégorisation rejoint celle effectuée sur la base des facteurs de rétentions en mode gradient linéaire comme en gradient optimisé des sept phases stationnaires. De ces observations (**Fig.33-34 et 37**), les phases avec particules totalement poreuses sont plus rétentes mais moins sélectives par rapport aux phases avec particules partiellement poreuses. La similarité de comportement entre les colonnes classiques est particulièrement surprenante dans la mesure où nous aurions pu nous attendre à plus de diversité en termes de comportement chromatographique et au vu de la sélectivité prédite de nos phases stationnaires. Une possible explication serait que les prostanoides interagissent avec les phases stationnaires de façon très similaire. Les colonnes classiques n'offrent pas une sélectivité satisfaisante car trop proche de 1 à la différence des colonnes core shell dont la sélectivité varie de 1,3 à 2 (**Fig.37**). Accucore™ C18 Polar et Cortecs Shield C18 (phases stationnaires avec GPI) ont une sélectivité comparable avec deux co-élutions.



**Figure 37 : Evaluation de la sélectivité des sept phases stationnaires pour la séparation des prostanoides en gradient linéaire.**

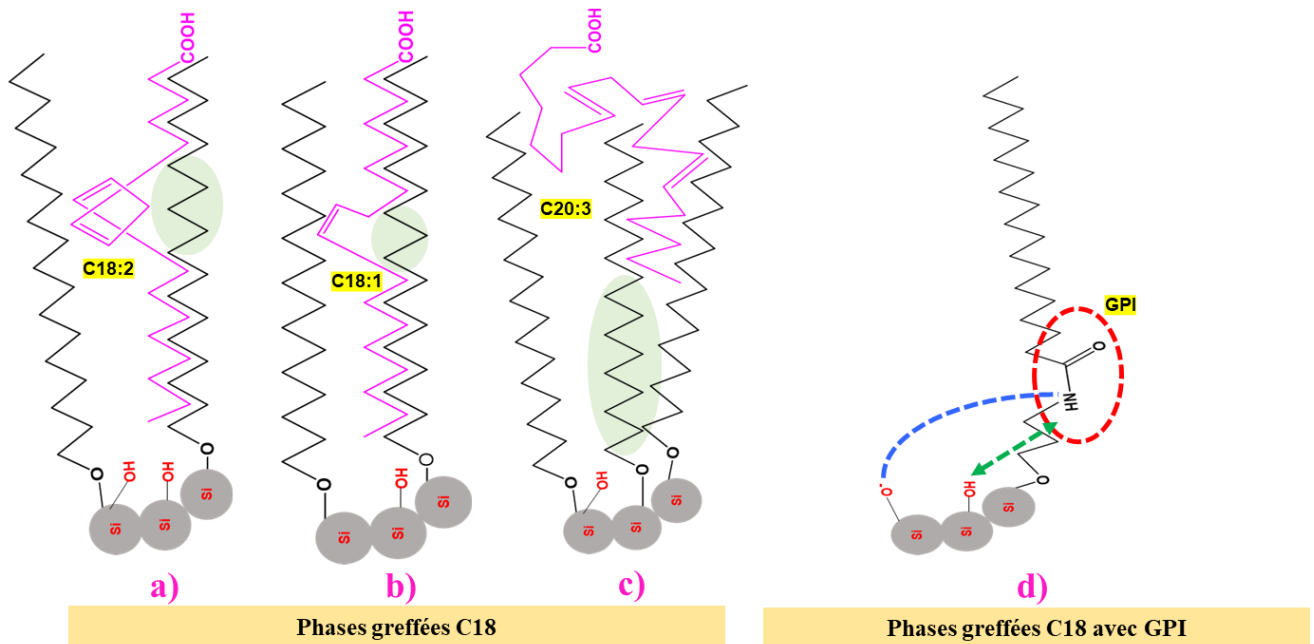
Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50µg/ mL ; Vinj = 1µL.

Pour le profil complet des eicosanoïdes par RP-HPLC (**Fig.41**), des co-élutions supplémentaires ont été observées pour les colonnes avec GPI. Ces co-élutions ne seraient pas le seul fruit des interactions des GPI. Considérons l'exemple des thromboxanes co-élus TXB1 et TXB2 sur les colonnes avec GPI. Ces deux molécules diffèrent uniquement par le nombre d'insaturations. Sachant qu'une insaturation ne peut être susceptible d'interactions polaires et en faisant appel au modèle de soustraction hydrophobe, on peut déduire que la résistance stérique à la pénétration opposée par les greffons des colonnes avec GPI serait à la base de la co-élution de TXB1 et TXB2. Ces observations confirment les valeurs de S prédites par le modèle pour les phases avec GPI. En revanche, Accucore™ C30 et Accucore™ C18 montrent une seule co-élution correspondant à la co-élution du 6-céto PGF1α et PGI2. Afin d'illustrer notre explication



en ce qui concerne les mécanismes moléculaires impliqués pour la rétention d'AGPI, nous avons proposé une représentation schématique (**Fig.38**). La **figure 38** illustre l'insertion de trois AGPI C18 :1 C18 :2 et C20 :3 sur une phase greffée C18. Chaque insaturation induirait une réduction de la surface de contact entre le soluté et la phase stationnaire impliquant ainsi une diminution de la rétention. La diminution de la rétention (surface en vert sur les greffons) comme le montre la **figure 38** semble proportionnelle au nombre d'insaturations. Cette surface de contact soluté-greffon de la phase stationnaire participe donc aussi à la sélectivité entre les composés d'intérêt. Le nombre et la position des insaturations impliquent *ipso facto* une géométrie particulière à la molécule se traduisant par une résistance à la pénétration lors de l'interaction soluté-phase stationnaire (**Fig.38**).

Une question qui pourrait être déduite de nos observations est la suivante : un pourcentage de greffage élevé ne serait pas un facteur limitant à la pénétration des solutés polyinsaturés dans les greffons? Nombre de travaux ont été réalisés pour tenter de comprendre les interactions moléculaires des solutés au contact de la phase stationnaire. Les mécanismes moléculaires d'interactions [155,190,206] et de pénétration de solutés tels que les triglycérides [263,267,268] dans les greffons des phases stationnaires à polarité de phases inversée ont largement été étudiés dans la littérature. Suivant les travaux de Tchaplà et Guiochon en 1984, le changement d'interaction moléculaire est dépendant de la longueur de chaîne greffée sur les silices [268]. En effet, l'évaluation du Logk en fonction de l'augmentation de la sélectivité méthylène de molécules sur des phases monomériques greffées C1, C6, C8, C18 montre une corrélation linéaire pour C1 mais un changement de pente à partir d'une certaine sélectivité méthylène pour les phases greffées C18 et C8 [263,268]. La discontinuité dans la linéarité de la droite a été expliquée par Martin, *et al.* [263] comme le reflet d'un changement de conformation des molécules au cours de leur pénétration dans les greffons des phases stationnaires. Du fait de l'encombrement stérique, la tête glycérique se dispose à l'opposé du sens de pénétration dans les greffons. Des études spectroscopiques RMN et X-Ray de conformations structurales de triglycérides [269] montrent que les deux chaînes de l'extrémité sont orientées dans le même sens et la chaîne du milieu en sens opposé. Il se produit donc une pénétration partielle du fait de l'encombrement et de la présence de doubles liaisons [263].



**Figure 38: Schéma illustrant le mécanisme de rétention des acides gras polyinsaturés, la résistance stérique à la pénétration et des interactions polaires secondaires sur une phase C18 et une phase C18 avec groupements polaires intégrés(GPI).**

a, b et c montrent l'influence du nombre et de la position des insaturations des acides gras polyinsaturés sur leur rétention sur une phase stationnaire à polarité de phases inversée. Les flèches en vert indiquent les interactions de type liaison hydrogène entre un silanol non ionisé et le groupement carboxyle du soluté ou un groupement donneur ou accepteur tel que le carbamate du GPI. Les flèches en bleu montrent les interactions ioniques de type échange de cation entre un silanol ionisé et un groupement soit de la phase stationnaire ou des groupements du soluté. d est une illustration d'une phase greffée C18 avec GPI à l'origine de diverses interactions type liaison hydrogène ou d'échange d'ions susceptible de se produire au cours d'une séparation chromatographique. C18 :1 pour acide oléique, C18 :2 pour acide linoléique, C20 :3 pour acide homo-gamma-linolénique, GPI pour groupement polaire intégré.

#### 4.3.2. La capacité de pic ( $P_c$ )

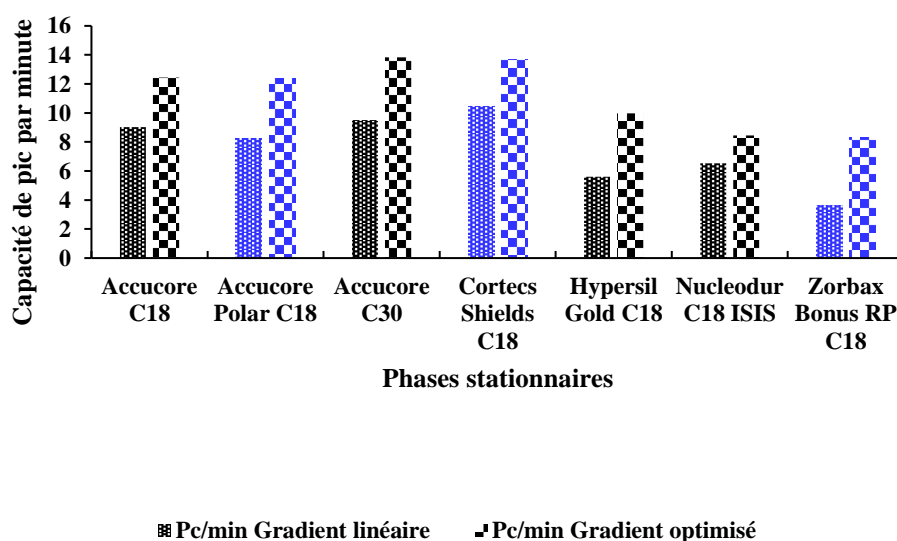
Afin de s'affranchir de l'hétérogénéité du temps de gradient entre les analyses en gradient linéaire et ceux en gradient optimisé, nous avons défini une capacité de pic par minute. La capacité de pic par minute a été définie comme la mesure du nombre de pics qui peuvent être contenus dans une fenêtre de temps d'éluion d'une minute.

$$P_c / \text{min} = \frac{P_c}{t_g} \quad \text{Equation 44}$$

En combinant l'équation 36 et 44, on déduit une équation globale pour la capacité de pic par minute :

$$P_c / \text{min} = \frac{1 + \frac{t_g}{\left(\frac{1}{n}\right) \sum_1^n \omega}}{t_g} = \frac{1}{t_g} + \frac{1}{\left(\frac{1}{n}\right) \sum_1^n \omega} \quad \text{Equation 45}$$

La capacité de pic par minute obtenue en mode gradient optimisé est plus élevée que celle en mode gradient linéaire (**Fig.39**). Ceci s'explique par le fait que les pics obtenus dans une analyse en mode gradient optimisé bénéficient d'une compression des bandes d'élution des pics [264]. Les colonnes « core shell » offrent une plus grande capacité de pic par minute pour l'analyse des eicosanoïdes. Enfin, Accucore™ C30 et Cortecs Shield C18 montrent les meilleurs résultats avec une capacité de pic par minute d'environ 10 en mode gradient linéaire et de 14 en mode gradient optimisé.



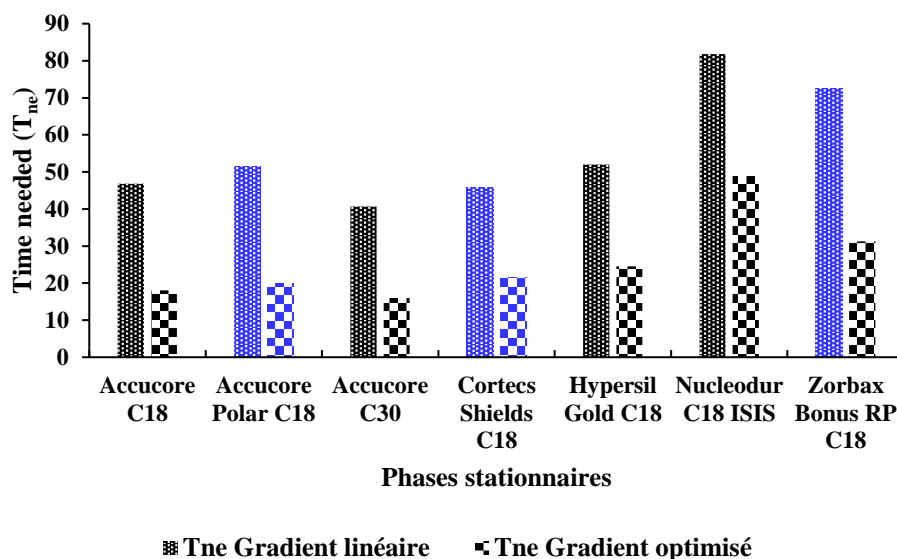
**Figure 39: Capacité de pic par minute en fonction des phases stationnaires.**

Gradient linéaire (Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; Débit = 0.5 mL/min ; T = 25°C; Vinj = 1µL., Gradient optimisé (**Annexe I-2**)

#### 4.3.3. Le time needed ( $T_{NE}$ )

Le time needed a été calculé à partir de l'équation 39 précédemment décrite (**Partir I-Chapitre IV-2.4.5**). La **figure 40** montre que le temps théorique nécessaire pour séparer tous les composés de notre mélange est relativement plus faible pour Accucore™ C30 (de l'ordre de 40 minutes en mode gradient linéaire à 15 minutes en mode gradient optimisé) par rapport aux autres phases stationnaires.

En résumé, toutes les phases stationnaires type core shell offrent de meilleures performances chromatographiques par rapport aux autres. Notre étude permet de souligner que Accucore™ C30 même étant la moins rétentive semble offrir une capacité de pic plus élevée et une séparation beaucoup plus rapide (**Annexe I-5**).



**Figure 40: Evaluation du time needed pour la séparation d'un mélange complexe d'eicosanoïdes sur les sept phases stationnaires.**

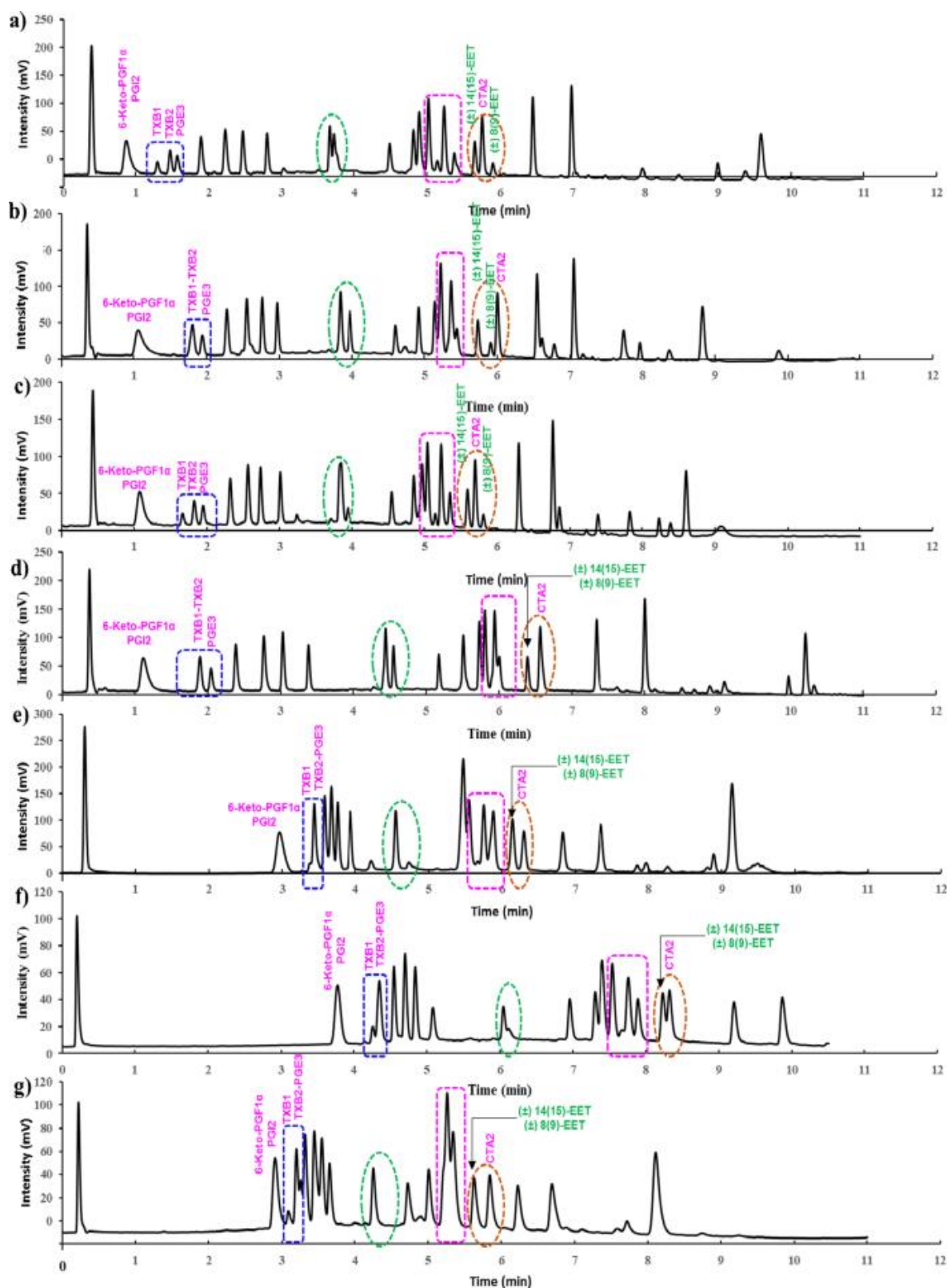
Gradient linéaire (Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; T = 25°C ; V injecté = 1µL ; Débit = 0,5mL/min, Gradient optimisé (Annexe I-2)

#### 4.4. Comparaison des meilleurs profils chromatographiques des sept phases stationnaires à polarité de phases inversée

L'analyse de l'ensemble des profils montre une séparation en sous-familles d'eicosanoïdes (PG, LTB4, DiHETE, EET, HODE et HETE). L'ordre d'éluion habituellement obtenu est le suivant : PGs, LTs, DiHETE, HEPE, HODE, HDHA, HETE, EET et enfin les précurseurs des eicosanoïdes (EPA et AA). Les eicosanoïdes les plus hydrophiles (les plus polaires) tels que les PG éluent très vite. En effet, les prostaglandines (PG) avec de multiples groupes hydroxyles et un cycle prostané rigide à 5 carbones, constituent la sous-famille la plus polaire des eicosanoïdes. Les molécules les plus hydrophobes comme les HETE/EET requièrent une grande proportion de solvant organique (acétonitrile ou méthanol) dans la phase mobile pour leur éluion. L'utilisation de l'isopropanol même en faible proportion (10%) induit une perte significative de l'efficacité et donc un élargissement des pics sur toutes les phases stationnaires de cette étude à l'exception de Cortecs Shield C18. Ce phénomène s'explique par la viscosité trop élevée de l'isopropanol qui augmente la résistance au transfert de masse (Terme C de l'équation de Van Deemter) par ralentissement de la cinétique d'échange phase stationnaire-phase mobile. L'ajout de 30% d'isopropanol dans la phase mobile B pour la phase Cortecs Shield C18 permet de mieux séparer les HETE, espèces qui co-éluent dans les travaux antérieurs [39,82].

L'analyse des différents profils de séparation (**Fig.41**) permet de se rendre compte que toutes les colonnes n'ont pas la même sélectivité de séparation, confirmant ainsi les prédictions suivant les radar plots réalisés à partir des données du modèle HSM (**Fig.28**). Les colonnes avec particules superficiellement poreuses (core shell) offrent de meilleurs profils de séparation. Les phases stationnaires de type core shell à l'exception de Cortecs Shield C18 offrent non seulement une analyse relativement plus rapide (7 minutes) mais une sélectivité satisfaisante pour les PG et les HETE. Ces méthodes sont donc nettement plus rapides que celle développée dans la littérature avec une colonne Symmetry C18 pour le profilage de 23 oxylipines [247]. Le *F<sub>s</sub>* (**Annexe I.6**) calculé pour la phase stationnaire Symmetry C18 montre qu'elle aurait une sélectivité proche de celle de Cortecs Shield RP18 et Nucleodur Isis C18. Les colonnes de type core shell avec GPI ne séparent pas les thromboxanes et se distinguent aussi par soit une inversion de l'élution des EET (acide epoxy-eicosatétraénoïque) ou soit leur co-élution (cas de Cortecs Shield RP18 (**Fig.41-c**)). Ces co-élutions observées pour ces phases avec GPI seraient dues aux interactions polaires secondaires entre les GPI et les composés et/ ou les silanols (confère les termes A, B, C du modèle de soustraction hydrophobe). Sur la base d'un criblage de plusieurs phases stationnaires de différentes chimie (C8, C18, PFP, Polar RP), les travaux de Rago, *et al.* [39] ont permis de sélectionner la phase Synergi-Fusion RP (2.1 x100 mm, 2,5 μm) qui permet d'obtenir une meilleure résolution globale dans le profilage de 18 eicosanoïdes. Ils ont attribué les meilleurs résultats obtenus à la présence du GPI de nature éther phényle dans cette phase. Dans notre étude, la phase Accucore™ C30 sépare avec une meilleure sélectivité d'une part le 15-HETE et le 8-HETE et, d'autre part, le 14,15-EET et 8,9-EET en comparaison au profil issu des travaux de Rago, *et al.* [39]. Suivant le facteur *F<sub>s</sub>* (**Annexe I.6**) de Synergi-Fusion RP vis-à-vis de nos phases stationnaires, seuls Nucleodur Isis C18 et Hypersil Gold™ C18 lui sont proches en termes de sélectivité prédictive. Toutefois, il est important de garder à l'esprit le fait que les phases utilisées dans les études [247] et [39] n'ont pas les mêmes caractéristiques de particules que les nôtres. A l'aide d'une colonne BEH C18 (150 × 2.1 mm, 1.7 μm), une séparation de 64 oxylipines en chromatographie ultra haute performance en fluide supercritique a été réalisée avec une bonne sélectivité globale malgré la co-élution de certaines espèces [214]. Le *F<sub>s</sub>* calculé (**Annexe I.6**) pour cette colonne trifonctionnelle BEH permet de se rendre compte qu'elle est attendue à être beaucoup plus proche des colonnes sans GPI de notre étude. Suivant nos résultats, la phase stationnaire Accucore™ C30 (**Fig.41.c et 46**) sépare mieux les HETE d'une part, et 14,15-DiHETE vis-à-vis de 5,6-DiHETE d'autre part comparé aux travaux de Berkecz, *et al.* [214]. Enfin, Accucore™ C30 et Accucore™ C18 montrent des profils comparables (**Fig.41**). Au vu des performances décrites plus haut en termes de capacité

de pic, de temps d'analyse et de sélectivité, l'Accucore™ C30 semble la plus propice à l'analyse des eicosanoïdes [270].



**Figure 41: Chromatogrammes obtenus pour des conditions optimales de séparations des eicosanoïdes pour les sept phases stationnaires.**

(a) Accucore™ C18; (b) Accucore™ Polar Premium; (c) Accucore™ C30; (d) Cortecs Shield C18; (e) Hypersil Gold™ C18; (f) Nucleodur Isis C18; (g) Zorbax Bonus RP. Entouré en pointillé bleu : TXB1, TXB2, PGE3. Entouré en pointillé vert : Leucotriènes et 14,15-DiHETE, En rose : les HETEs. En orange : les EETs et CTA2) Pour la composition de la phase mobile et les gradients optimisés, voir Annexe I.2 et 4. T = 25 °C; Concentration du mélange de standards = 50 µg/mL; V injec = 1 µL; Débit = 0.5 mL/min.

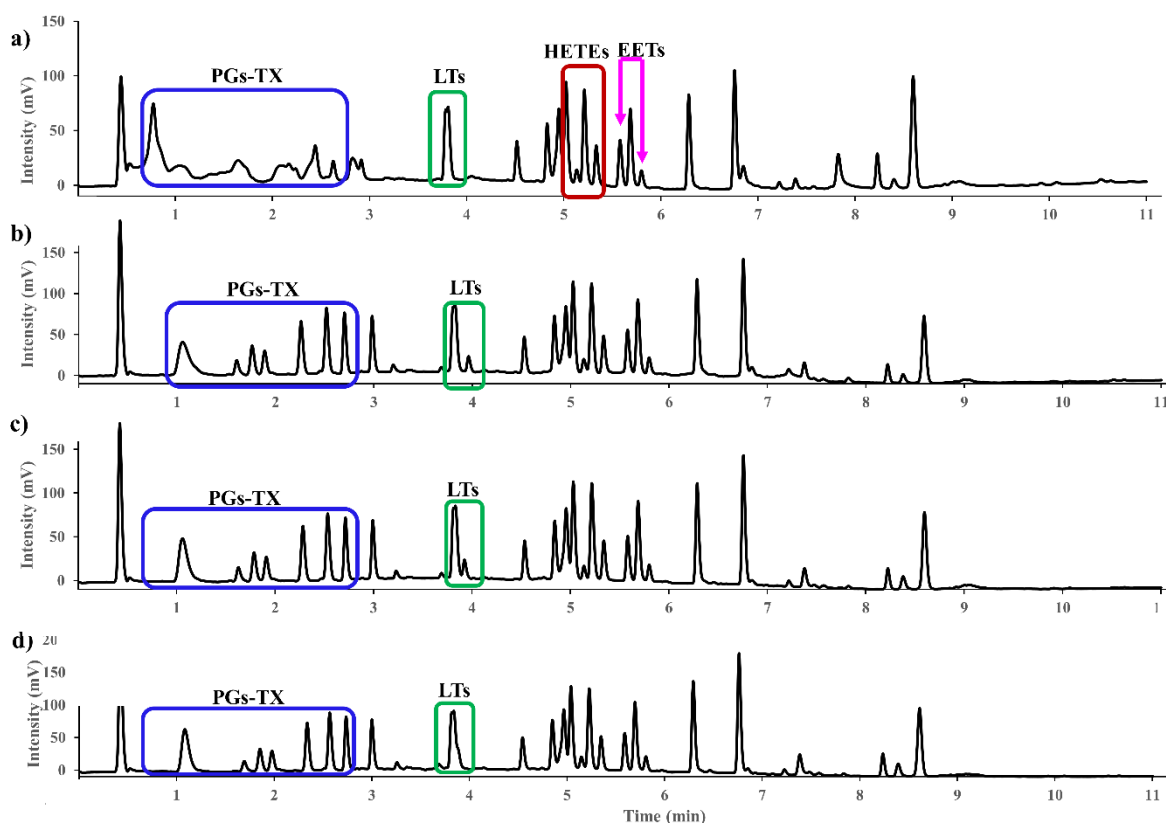
## 4.5. Evaluation de l'impact du pH et de la température sur la séparation des eicosanoïdes

### 4.5.1. Evaluation de l'influence du pH

Une évaluation de l'influence du pH par ajout de différentes proportions d'acide formique (0 ; 0,02% ; 0,04% ; 0,08% et 0,1%) a été effectuée.

L'ajout de l'acide formique semble indispensable à l'élution des prostanoïdes (entourés en bleu foncé, **Fig.42-a**) et déterminant dans la séparation des leucotriènes (**Fig.42**). Ces résultats concernant les leucotriènes sont en accord avec ceux de Mathews, *et al.* [271] et Powell [272]. Les travaux de Mathews, *et al* [271] ont permis de montrer que les peptido-leucotriènes ont un comportement chromatographique différent par rapport aux autres eicosanoïdes et sont fortement impactés par la variation du pH. D'après ces travaux, le LTB<sub>4</sub> s'avère plus retenu que le LTC<sub>4</sub> à un pH 6, l'inverse étant vrai dans les conditions acides [271]. Ces observations sont contraires à celles de Raquel Martin-Venegas [51] mais confirment ceux de William Powell [143]. Si le profil des prostanoïdes en (**Fig.42-a**) était lié aux interactions secondaires indésirables liées aux silanols ionisés, l'on s'attendrait à plus de rétention des prostanoïdes en l'absence d'acide formique. Tout se passe comme si les prostanoïdes imposaient leur pH à la phase stationnaire en l'absence d'ajout de l'acide formique. Ces interactions avec la phase stationnaire se font suivant une cinétique lente expliquant la traînée de pic. Aussi il faut noter que le pH n'a aucun impact significatif sur la rétention des HETE/EET. Au vu de nos résultats, une proportion de 0,04% correspondant à un pH approximatif de 3 a donc été retenue pour la méthode sur Accucore C30.



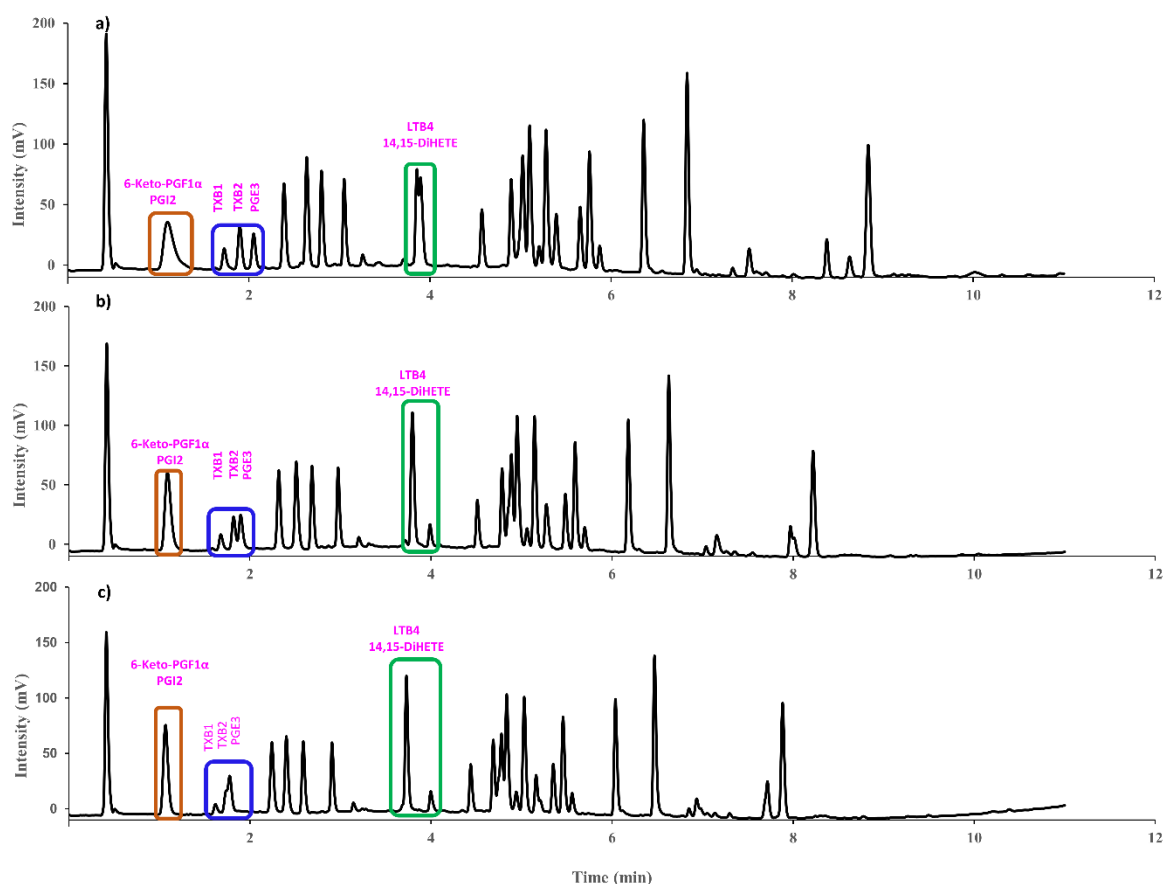


**Figure 42: Evaluation du pH de la phase mobile sur la rétention des leucotriènes sur Accucore™ C30.**

Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30, v/v), B (Acétonitrile,100,v) contenant (a) 0% HCOOH; (b) 0.02% HCOOH; (c) 0.04% HCOOH; (d) 0.08% HCOOH; T = 25 °C; Concentration du mélange de standards = 50 µg/mL; V injec = 1 µL; Débit = 0.5 mL/min. PGs-TX: prostaglandines-thromboxanes; LT: leucotriènes.

#### 4.5.2. Evaluation de la température

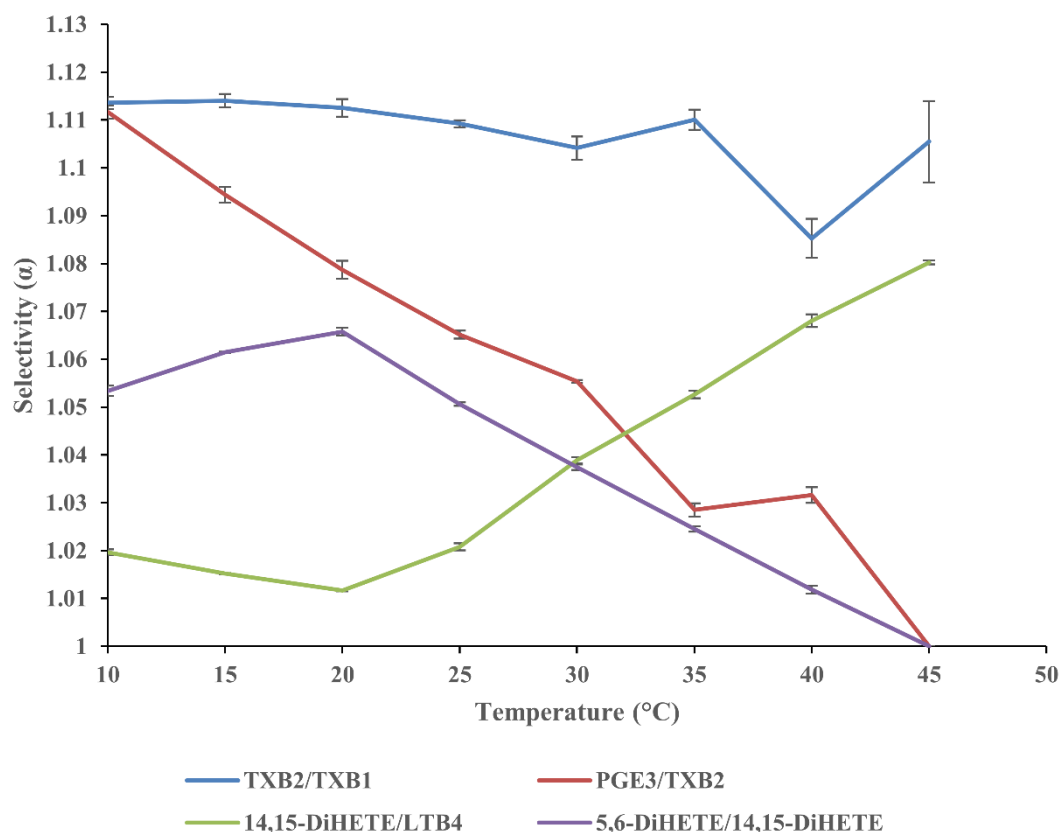
Une température au-delà de 30°C induit une diminution de la résolution de TXB2 et PGE3 (en bleu **Fig. 43**) aboutissant à leur co-élution à partir de 45°C. Quelle que soit la phase stationnaire utilisée, le premier pic correspond à une co-élution du 6-céto PGF1 $\alpha$  et de la PGI2. Notons que le 6-céto PGF1 $\alpha$  est une forme tautomère de la PGF2 $\alpha$ . L'augmentation de la température permet de réduire l'effet tailing du pic correspondant à la co-élution du 6-Céto PGF1 $\alpha$  et la PGI2. Une injection de la PGI2 seule permet de déduire que la co-élution serait due à l'existence d'interactions polaires secondaires entre la 6-céto PGF1 $\alpha$  et la phase stationnaire. Une diminution de pH de la phase mobile (**Fig. 42**) est sans effet sur cette co-élution et permet de déduire que la perte d'efficacité du pic serait liée à une interaction de type liaison hydrogène entre un hydrogène donneur du silanol et la cétone accepteuse de liaison hydrogène (6-céto PGF1 $\alpha$ ) qui retarde la cinétique d'échange.



**Figure 43: Effet de la température sur la rétention des eicosanoïdes sur Accucore™ C30.** Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH ; a) T = 30°C ; b) T=35°C ; c) T= 45°C ; Concentration du mélange de standards = 50 µg/mL; V injecté = 1µL ; Débit = 0,5mL/min

Dans la mesure où il était particulièrement compliqué de séparer certains isomères (TXB1-TXB2-PGE3 d'une part et LTB4-14,15-DiHETE-5,6-DiHETE d'autre part), nous nous sommes intéressés à l'impact de la température sur la sélectivité de reconnaissance de forme entre ces molécules. La co-élution constatée de la TXB2 et PGE3 à partir de 45°C permet de déduire que la température influence significativement la sélectivité stérique. La **figure 44** traduit l'évaluation de la sélectivité entre 4 couples d'eicosanoïdes isomères ou isobares en fonction de l'augmentation de la température. Suivant cette **figure 44**, lorsque la température augmente, la reconnaissance de forme diminue ; aboutissant à une co-élution entre TXB2 et PGE3. Ces faits confirment les résultats de la littérature [273]. En revanche, l'augmentation de la température permet d'augmenter la sélectivité entre le 14,15-DiHETE et le LTB4. On peut déduire que l'impact de la température sur la sélectivité est dépendant de la structure de la molécule. Au vu de la variation globale de la sélectivité entre TXB2/TXB1, PGE3/TXB1, 14,15-DiHETE/LTB4 et 5,6-DiHETE/ 14,15-DiHETE, nous avons choisi une température de

20°C comme compromis pour l'analyse des eicosanoïdes. Toutefois, il n'y avait pas de différence significative entre le profil global des eicosanoïdes à 20 et 25°C.



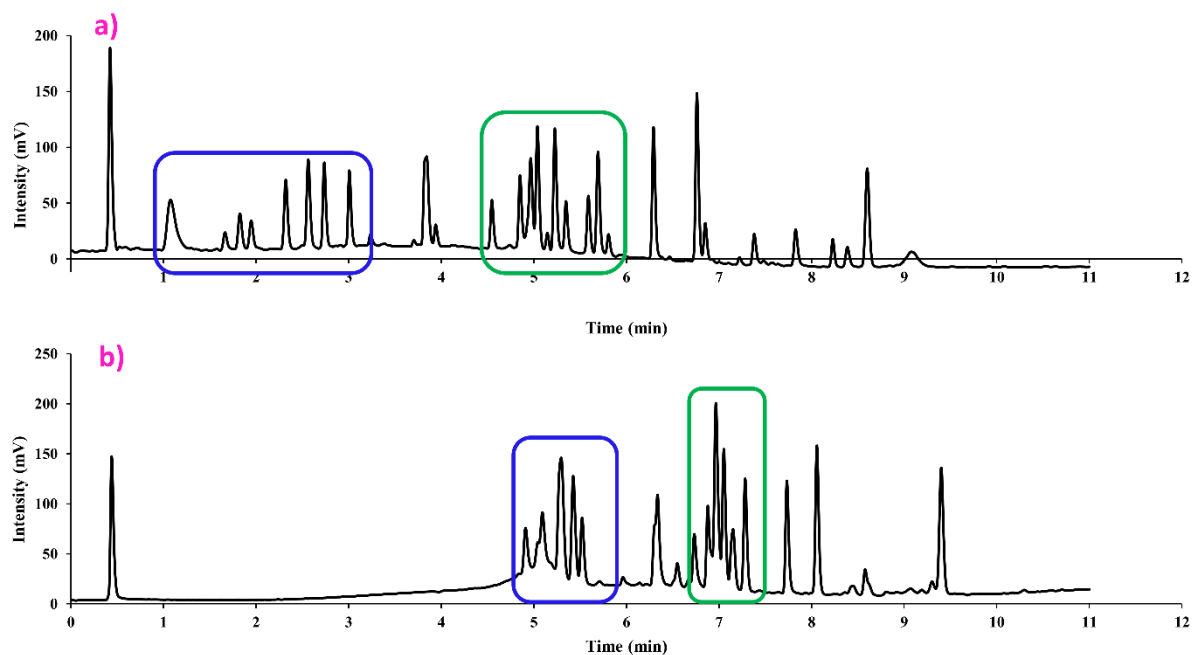
**Figure 44: Evaluation de la sélectivité en fonction de l'augmentation de la température entre certains isomères d'eicosanoïdes sur Accucore C30.**

Le mélange 1 a été injecté trois fois pour chaque température (10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, and 45 °C). Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart type. Les autres conditions chromatographiques sont les suivants : Phase mobile : A (Eau: Acétonitrile, 70:30, v/v) contenant 0.04% HCOOH; B (Acétonitrile, 100, v) contenant 0.04% HCOOH; Concentration du mélange de standards = 50  $\mu$ g/mL; V injec = 1  $\mu$ L; flow rate = 0.5 mL/min.

#### 4.6. Effet de l'acétonitrile et du méthanol sur la séparation des eicosanoïdes

Le méthanol est un promoteur de liaisons hydrogène tandis que l'acétonitrile solvate les analytes d'intérêts via des interactions dipolaires. Suivant nos résultats, la force éluante de l'acétonitrile est plus importante que celle du méthanol (Fig. 45 et Annexe I-7) et rejoint les observations faites dans une étude de séparation de molécules polyinsaturées [274]. Du fait que la séparation des isobares et isomères HETE s'avère difficile, l'effet des deux solvants sur leur sélectivité de séparation a été étudié. L'acétonitrile est non seulement plus éluant que le

méthanol mais offre une meilleure sélectivité entre les isomères de HETE en mode gradient (**Annexe I-7**). L'analyse en mode isocratique de la séparation des HETE en RP-HPLC a permis à Powell, *et al.* [275] de montrer que le méthanol offre une meilleure résolution de séparation des HETE (notamment 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE) mais avec des pics larges donc une moins bonne efficacité comparativement à l'acétonitrile. En revanche, cette méthode est très longue (~1 heure) et limitée à 5 espèces d'HETE et d'EET. L'analyse d'un mélange plus complexe d'eicosanoïdes par une phase mobile optimisée à base d'acétonitrile (**Fig. 45-a**) ou de méthanol (**Fig. 45-b**) comme phase organique montre que l'acétonitrile est plus éluant avec une meilleure sélectivité globale que ce soit pour les prostanoïdes (**Fig.45- a, bleu foncé**) ou les HETE et les autres espèces (**Fig.45-b, en vert**). Contrairement à nos observations selon lesquelles l'ajout d'acide formique est un prérequis à l'éluion des prostanoïdes par une phase organique à base d'acétonitrile, l'éluion par une phase mobile à base de méthanol des prostanoïdes est indifférente à l'ajout d'un modificateur de pH (**Annexe I.8**). Cela s'explique par le fait que le méthanol masque les interactions secondaires des silanols résiduels dans la phase stationnaire. Ce résultat en combinaison avec nos observations en **figure.42-a** permettrait de dire que le profil des prostanoïdes obtenu sur Accucore™ C30 sans modificateur de pH s'expliquerait probablement par des silanols résiduels ionisés qui interagissent par échange de cation et liaison hydrogène avec les prostanoïdes. La deuxième explication qui pourrait justifier cette observation vient du fait que le méthanol soit plus efficient que l'acétonitrile dans la compétition avec l'eau qui entoure les groupements hydroxyles des prostanoïdes du fait de ses possibles liaisons hydrogènes [275]. Ainsi, au cours d'une séparation en phase hydro-organique, le méthanol solvaterait mieux les prostanoïdes comparativement à l'acétonitrile en l'absence d'un modificateur de pH. La quasi co-éluion observée des acides epoxy-eicosatétraénoïque (8,9-EET et 14,15-EET) pour une séparation à base d'eau-méthanol (**Fig.45-b**) serait due à des liaisons hydrogènes entre l'atome d'oxygène (de l'époxy) accepteur de liaison hydrogène et l'hydrogène du méthanol aboutissant à une solvation non différentielle des deux isomères. Une phase mobile basée sur l'acétonitrile est suivant nos résultats le meilleur solvant pour séparer les espèces isobariques à l'instar des prostaglandines, en accord avec les résultats de Powell [272]. Cependant, des solvants plus polaires, tels que le méthanol, sont probablement nécessaires pour obtenir des pics plus fins et améliorer la résolution [51].



**Figure 45: Effet du changement de la phase organique sur la séparation d'un mélange complexe d'eicosanoïdes.**

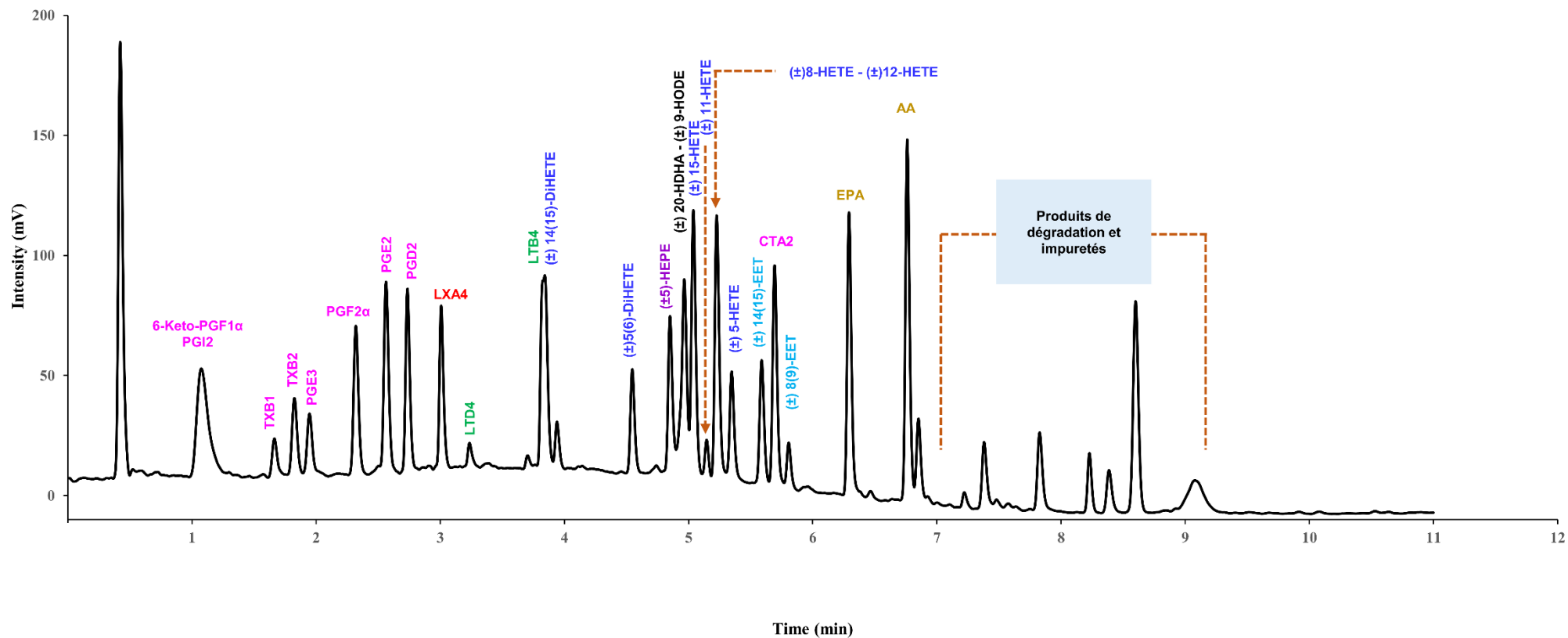
Phase stationnaire : Accucore™ C30(100mm x2,1mm x 2,6µm) ; T=25°C ; Phase mobile **a)** Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04%HCOOH, **b)** Phase mobile : A (Eau: MeOH, 50:50,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(MeoH,100,v) contenant 0,04%HCOOH. T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50 µg/mL; V injecté = 1µL ; Débit = 0,5mL/min.

## Conclusion

L'importance biologique et physiologique des eicosanoïdes a suscité l'intérêt de développer une méthode rapide capable d'analyser les isomères et isobares d'eicosanoïdes. Pour ce faire, nous avons eu recours à la chromatographie liquide à polarité de phases inversée. La RP-HPLC, une des techniques couramment utilisées en lipidomique [62,276–279], permet la séparation des lipides sur la base de leur hydrophobicité, le nombre et la position des doubles liaisons [280]. La ressemblance structurale des eicosanoïdes implique un choix de phase stationnaire adaptée à leur séparation. Sur la base du modèle HSM et du facteur  $F_s$  [198], sept phases stationnaires de chimie et de sélectivité différentes ont été sélectionnées. Des radar plots ont ensuite permis de s'assurer de l'hétérogénéité de sélectivité de nos phases stationnaires à polarité de phases inversée.

Une étude comparative sur la base des descripteurs de performances chromatographiques a permis de confirmer que les colonnes de type core shell sont plus efficaces [178]. Parmi les sept phases stationnaires étudiées, Accucore™ C30 s'avère la phase stationnaire la moins rétentive. Les colonnes avec GPI offrent une sélectivité globale meilleure pour les prostanoïdes mais non

satisfaisante pour discriminer certains isomères comme les thromboxanes (TX) et les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs). La sélectivité de séparation des isomères TXB1 et TXB2 nous a orienté vers une exploration des mécanismes moléculaires impliqués dans la séparation d'isomères de positions des eicosanoïdes en ce qui concerne la sélectivité stérique liée à la géométrie spatiale des solutés. Le meilleur profilage des eicosanoïdes obtenu suivant nos conditions optimisées (**Fig.46**) montre que Accucore™ C30 offre une meilleure sélectivité de séparation des prostaglandines comparée à des travaux récents [39,107,147]. Malgré son faible taux de greffage, Accucore™ C30 se distingue par une meilleure sélectivité, une grande capacité de pics et une analyse plus rapide (6 minutes). Enfin, un pH de 3 et une température de 20-25°C ont découlé de nos analyses comme propice à l'analyse des eicosanoïdes sur Accucore™ C30. Des performances de Accucore™ C30 pour sa capacité de séparation des lipides ont été rapportées dans la littérature [281]. Malgré nos optimisations en RP-HPLC et les performances de Accucore™ C30, de nombreuses co-élutions persistent : c'est le cas par exemple du 6-Céto-PGF1 $\alpha$  et la PGI $_2$ , le 20-HDHA et le 9-HODE. Aussi une quasi co-élution entre le LTB $_4$  et la 14,15-DiHETE est à noter. Pour cette raison, nous avons décidé d'explorer les performances de la NP-HPLC pour tenter de résoudre ces co-élutions voire améliorer la sélectivité entre d'autres espèces.



**Figure 46: Profilage de 24 oxylipines et 2 acides gras polyinsaturés par UHPLC à polarité de phases inversée sur Accucore™ C30.**

Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; Concentration du mélange de standards = 50 µg/mL; V injecté = 1µL ; Débit = 0,5mL/min

**Chapitre 2: Analyse des eicosanoïdes en  
Chromatographie à polarité de phases  
normale**



Compte tenu de la présence à l'état de traces et des ressemblances structurales des oxylipines, une séparation de toutes les espèces moléculaires en chromatographie liquide est requise pour améliorer la fiabilité de leur quantification. Malgré les efforts consentis pour un choix de phase stationnaire à polarité de phases inversée adaptée à l'analyse des oxylipines, de nombreuses co-élutions persistent [270]. Nous évaluons dans ce chapitre les performances de la NP-HPLC pour la séparation des eicosanoïdes.

## **I. Matériel et Méthodes**

### **1. Matériel**

#### **1.1. Solvants et Standards**

L'isooctane, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'acide acétique de qualité HPLC, ont tous été obtenus auprès de Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Rarement utilisé en NP-HPLC, l'acétonitrile de qualité HPLC-MS de Sigma Aldrich a également été utilisé pour optimiser nos séparations en NP-HPLC.

Les standards utilisés sont les mêmes que ceux présentés dans le chapitre 1 de la partie II (I.1.1)

#### **1.2. Les phases stationnaires testées**

Quatre phases stationnaires à savoir Nucleosil (silice vierge), Kinetex (silice vierge), Hypersil Gold™ CN et Luna NH2 ont fait l'objet d'étude. Les caractéristiques ainsi que les fournisseurs des différentes colonnes sont référencées dans le **tableau 12**.

**Tableau 12: Tableau récapitulatif des phases stationnaires à polarité de phases normale testées.**

Fournisseur	Machery Nagel	Phenomenex	Thermo Fisher	Phenomenex
<b>Nom commercial</b>	<i>Nucleosil</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Hypersil GOLD™ Cyano</i>	<i>Luna® NH2</i>
<b>Chimie</b>	Silice	Silice	CN	Aminopropyl
<b>Longueur (mm)</b>	150	150	100	150
<b>Diamètre interne (mm)</b>	2	2.1	2.1	2
<b>Diamètre des particules (µm)</b>	3	2.6	3	3
<b>% C</b>	–	–	4%	5 %
<b>Taille des pores (Å)</b>	100	100	175	100
<b>Surface spécifique (m<sup>2</sup>/g)</b>	340	–	220	320
<b>USP</b>	–	L3	L10	L8

### 1.3. La préparation des échantillons

Un mélange composé de 24 oxylipines et 2 AGPI (Tableau 8 ou Partie II chapitre I-1.1) solubilisés dans du chloroforme pour obtenir une concentration de 50µg/mL ont servi pour nos développements chromatographiques.

## 2. Méthodologie en NP-HPLC

Notre développement a été effectué sur une UHPLC (Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000) couplé à un détecteur d'aérosols chargés Corona CAD® avec les paramètres suivants : pression du gaz (Azote), 35 Psi; total flow, 1.53; flow ratio, 0.39; electrometer heater, 35 °C; corona voltage, 2.34 kV; Icor, 1.00Ua; IonT, 20.4 V; range, 100 pA. Le Corona CAD a été alimenté par un générateur d'azote (Esa nitrogen generator, Model N2-4000-L1252). L'isooctane, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'isopropanol, le méthanol et l'acétonitrile ont permis d'optimiser la phase mobile. L'ajout d'acide acétique a permis de limiter les interactions secondaires. Les autres conditions chromatographiques étaient : débit = 0,8mL/min, température du four = 20°C, volume d'injection = 2 µL.

## II. Résultats et discussion

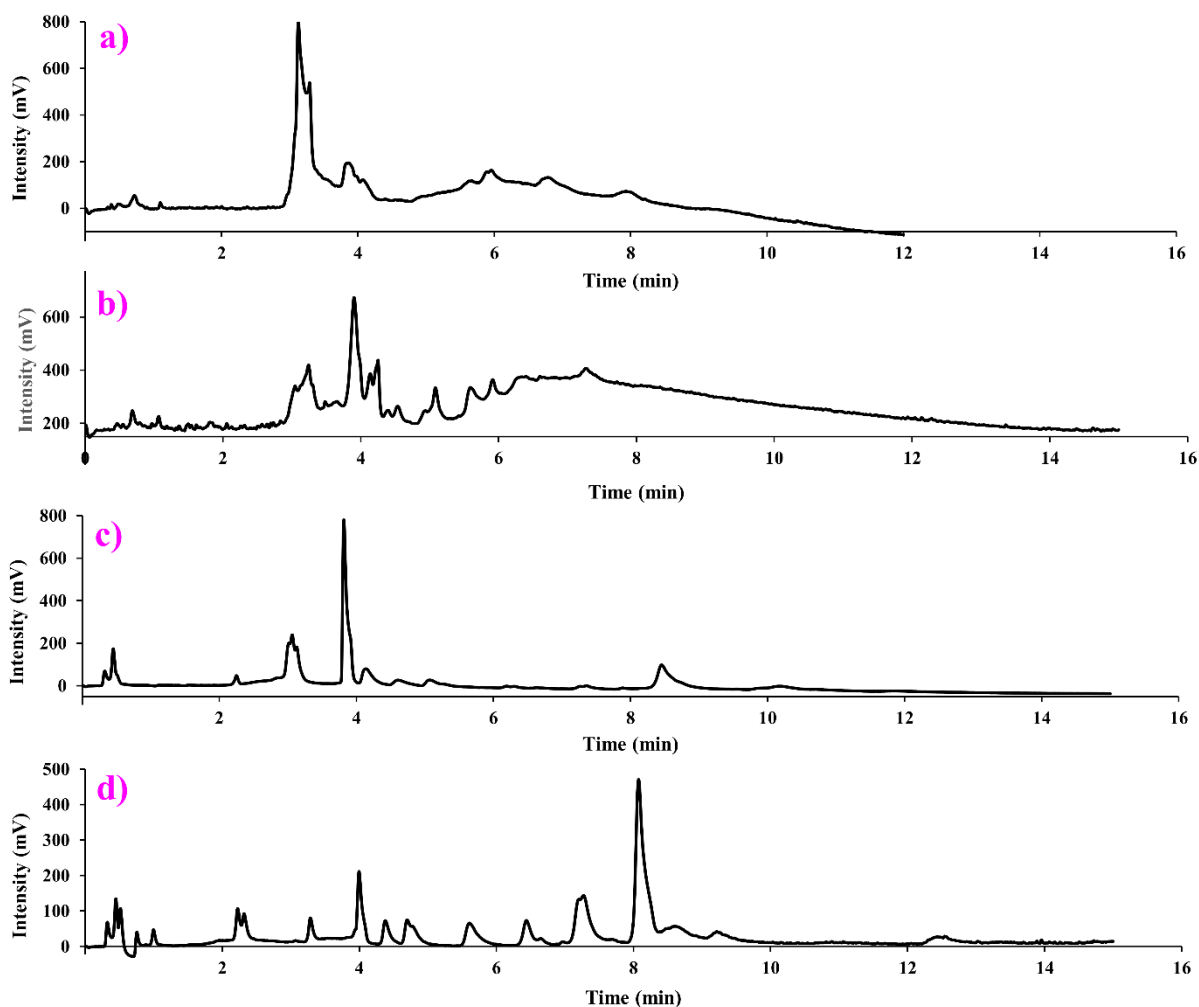
On peut regrouper nos phases stationnaires en deux grands groupes à savoir celle à silices partiellement poreuses (Kinetex) et celles totalement poreuses telles que Nucleosil, Luna NH2 et Hypersil Gold™ Cyano. Une analyse en mode gradient linéaire et optimisé a été réalisée de manière systématique sur toutes les phases stationnaires suivie de leur comparaison via des descripteurs de performance chromatographique plus particulièrement la sélectivité. Du fait des performances de particules de type core-shell décrites dans la littérature, nous avons choisi de commencer notre développement par la colonne Kinetex

### 1. Développement d'une méthode de séparation des eicosanoïdes sur Kinetex

#### 1.1. Optimisation de la phase mobile

Nous avons dans un premier temps eu recours à l'heptane comme phase mobile apolaire vers l'acétone en phase mobile polaire (**Fig.47, a**). Le résultat montre que quel que soient les optimisations effectuées en termes de gradient, ces solvants ne permettent pas de discriminer l'ensemble des 26 molécules. Le pic le plus important correspond à la majorité des espèces moléculaires sans les prostanoïdes. Les prostanoïdes éluent au milieu et fin de gradient avec des pics très larges quasiment confondus avec la ligne de base. L'augmentation de la force éluante du solvant B en associant l'acétone et l'isopropanol (**Fig.47, b**) est sans effet. L'ajout de l'isopropanol se traduit par une élution plus rapide des pics co-élus. La diminution de la force éluante par une phase B à base d'isooctane et d'isopropanol (**Fig.47,c**) permet d'améliorer la finesse des pics mais est moins adaptée pour distinguer l'ensemble des 26 molécules notamment celles co-élues au cours de notre développement en phase inverse (**Fig.46**)

Tous ces résultats nous ont orientés vers un solvant de sélectivité mixte en phase B à base de l'isooctane, acétate d'éthyle et d'isopropanol en proportion optimisée (**Fig.47,d**). En utilisant cette phase mobile en gradient linéaire, une meilleure séparation est obtenue même si des co-élutions subsistent. Cette phase mobile a ensuite été utilisée pour réaliser un développement en gradient optimisé suivi de sa comparaison avec le profil en gradient linéaire.

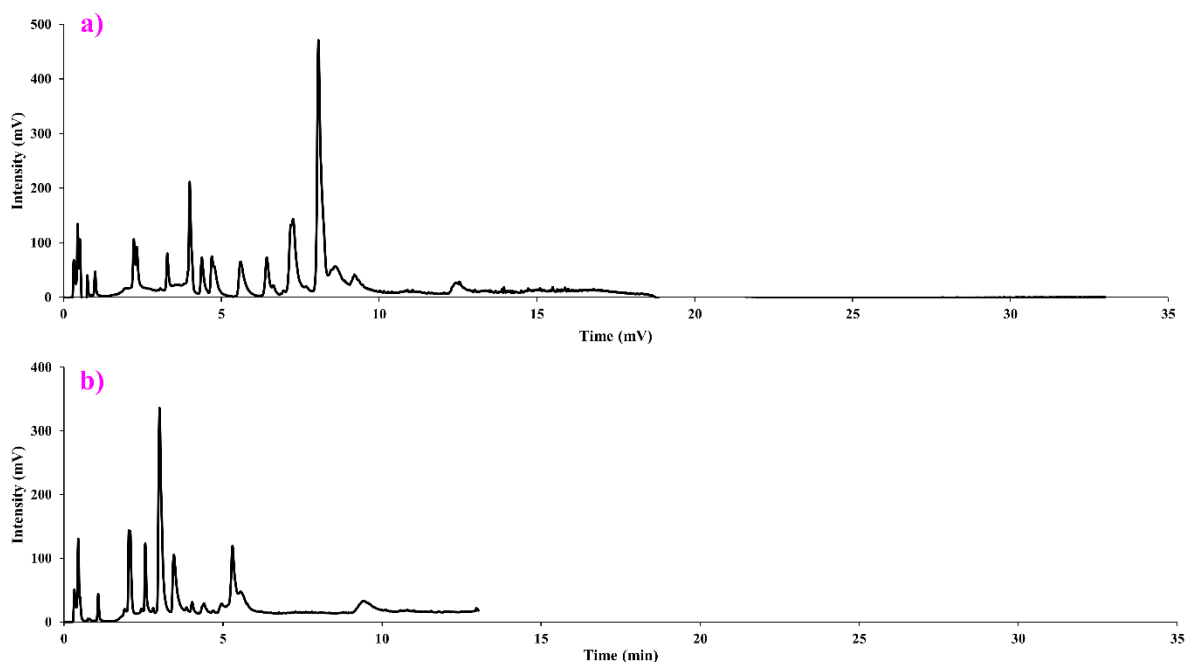


**Figure 47: Profils de séparation des eicosanoïdes en NP-HPLC sur Kinetex.**

a) Phase A : Heptane/Acide Acétique (99.96 :0.04, v/v), Phase B : Acétone/ Acide acétique (99.96 :0.04, v/v) ; b) Phase A : Heptane/Acide Acétique (99.96 :0.04, v/v), Phase B : Acétone/ Isopropanol/Acide acétique (84.96 :15 :0.04, v/v/v), c) Phase A : Isooctane/Acide Acétique (99.96 :0.04, v/v), Phase B : Isooctane/ Isopropanol/Acide acétique (84.96 :15 :0.04, v/v/v), d) Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (99.46 :0.5 :0.04, v/v/v), Phase B : Isooctane/Acétate d'éthyle/Isopropanol/Acide Acétique (19.96 :75 :5 :0.04, v/v/v/v). Tous les profils a),b),c) et d) ont été obtenus en mode gradient linéaire. Vinj = 1µL, Débit: 0,8 mL/min, T° : 20°C, Concentration: 50µg/mL

## 1.2. Comparaison de profils d'eicosanoïdes en gradient linéaire et gradient optimisé

Une optimisation de gradient et de phase mobile a été réalisée. Les meilleurs profils sont représentés à la **figure 48**. Une comparaison des meilleurs profils obtenus en gradient linéaire *versus* gradient optimisé (**Fig.48**) montre une séparation avec un nombre de pics plus important pour le gradient linéaire associé à une meilleure sélectivité.



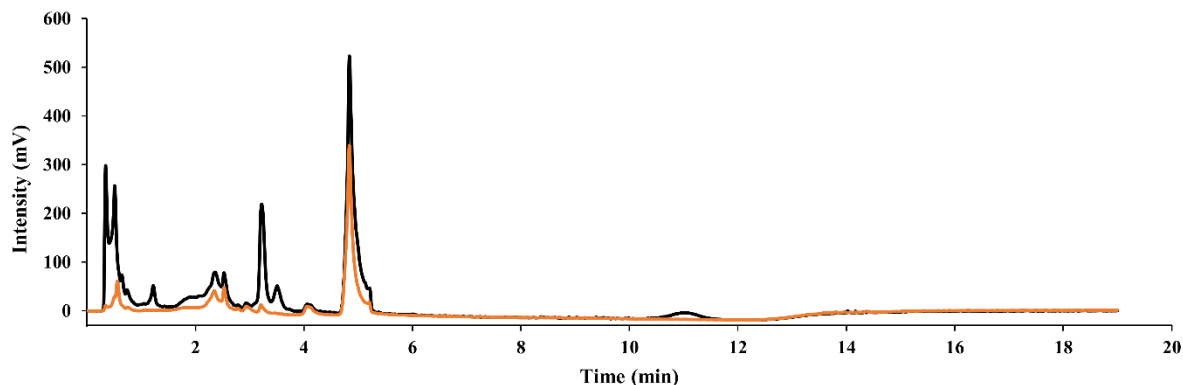
**Figure 48: Comparaison de profil des eicosanoïdes sur Kinexes avec la meilleure phase mobile.**

a) Gradient linéaire, b) Gradient optimisé. Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (99.46 :0.5 :0.04, v/v/v), Phase B : Isooctane/Acétate d'éthyle/Isopropanol/Acide Acétique (19.96 :75 :5 :0.04, v/v/v/v). Vinj = 1 $\mu$ L, Débit: 0,8 mL/min, T° : 20°C, Concentration : 50 $\mu$ g/mL

## 2. Développement de la séparation des eicosanoïdes sur Luna NH2

### 2.1. Optimisation de la phase mobile

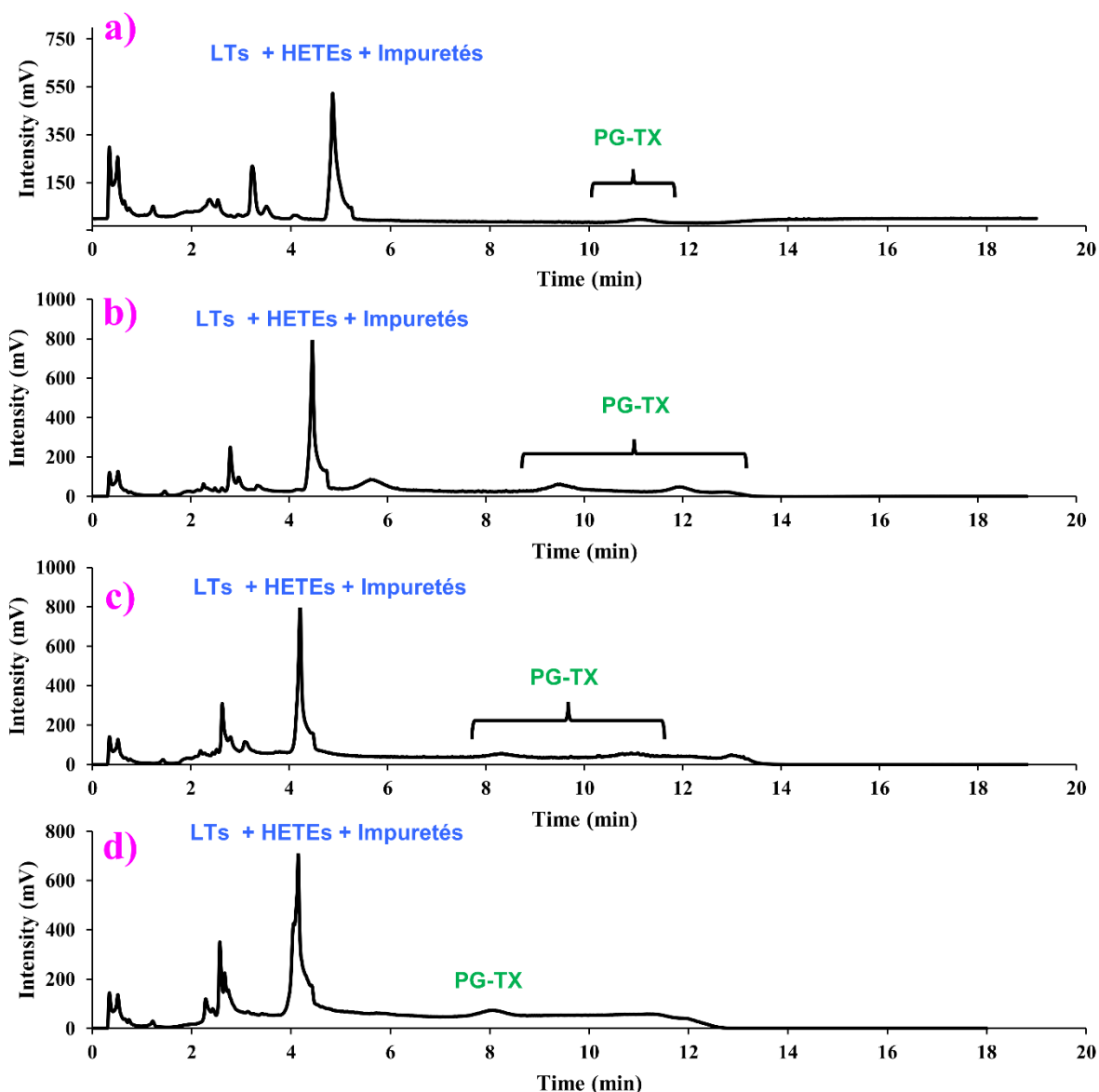
Sur la base des résultats d'optimisation sur Kinetex, le développement sur Luna NH2 a commencé par une phase mobile à base d'isooctane et d'acétate d'éthyle. En effet, l'acétate d'éthyle est un solvant de polarité moyenne et accepteur de liaison hydrogène. Le premier résultat de notre développement sur Luna NH2 (**Fig.49**) est surprenant dans la mesure où l'on aurait pu s'attendre à une meilleure séparation. En superposant ce profil d'eicosanoïdes à un profil de blanc (chloroforme injecté), on s'aperçoit que l'isooctane contiendrait des impuretés de polarité proche des eicosanoïdes, qui s'accumulent et éluent au fur et à mesure de l'augmentation du pourcentage d'acétate d'éthyle. Une double purification de l'isooctane a été réalisée au travers de la silice vierge pour réduire le taux d'impuretés. Le profil ci-dessous (**Fig.49**) montre un dédoublement de pic pour le pic du solvant. Ceci serait probablement dû au fait que notre solvant d'injection soit plus fort que la phase mobile A.



**Figure 49: Séparation des eicosanoïdes sur Luna NH2 avec une phase mobile à base d'isooctane et acétate d'éthyle.**

Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (97.96 :2 :0.04, v/v/v), Phase B : Acétate d'éthyle/Acide Acétique (99.96 :0.04, v/v).  $V_{inj} = 1\mu\text{L}$ , Débit: 0,8 mL/min,  $T^\circ : 20^\circ\text{C}$ , Concentration : 50 $\mu\text{g/mL}$ . En noir : Mélange de 26 molécules (eicosanoïdes + AGPI), en orange : blanc (injection de chloroforme).

L'analyse de la **figure 50** montre plusieurs pics correspondant à des co-élutions. A titre d'exemple, la quasi-totalité des leucotriènes co-éluent avec des impuretés de l'isooctane. L'étalement des pics de prostaglandines et thromboxanes (PG-TX) nous a orienté vers l'utilisation de l'acétone en proportion 50-50 avec l'acétate d'éthyle (**Fig.50-b**). L'acétone a permis ainsi d'obtenir une meilleure séparation en passant d'un pic à deux pour les prostanoïdes. Néanmoins la séparation des isomères et isobares d'HETE ou même de prostanoïdes est impossible dans ces conditions de solvant et quelle que soit l'optimisation du gradient. L'augmentation de l'acétone dans la phase B n'a aucun effet sur l'efficacité et la résolution des pics (**Fig.50-c**). Ensuite, en utilisant une phase B à base de méthanol et d'acétate d'éthyle, une co-élution de l'ensemble des composés d'intérêts et des impuretés est observée (**Annexe II.1**). En revanche, l'ACN est difficilement miscible à l'isooctane. Pour ce faire, nous avons utilisé l'acétate d'éthyle comme co-solvant afin d'avoir un mélange miscible et monophasique avec l'ACN. Le résultat montre que ni l'ACN, ni le méthanol ne permettent la séparation des eicosanoïdes sur une phase LUNA NH2 (**Fig.50- d**).



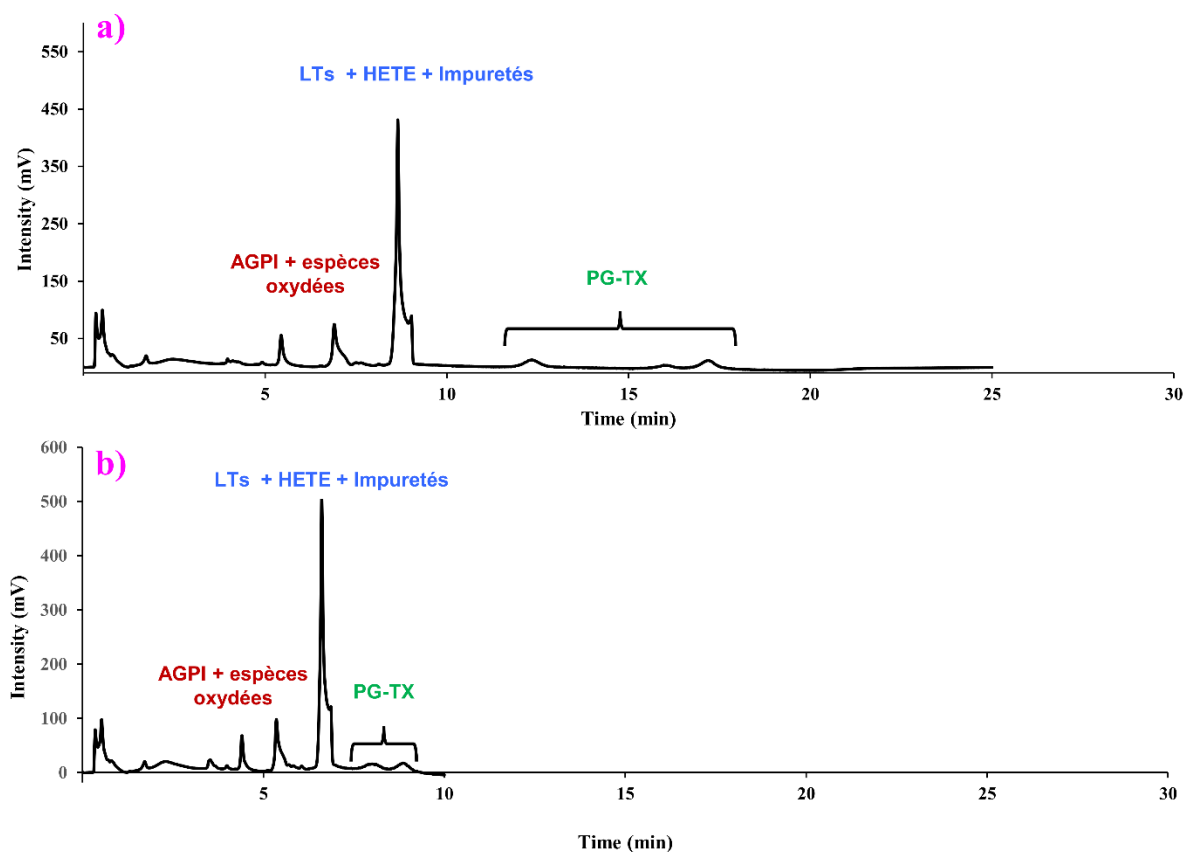
**Figure 50: Optimisation de phases mobiles pour la séparation des eicosanoïdes sur Luna NH2 en gradient linéaire.**

a) Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (97.96 :2 :0.04, v/v/v), Phase B : Acétate d'éthyle/Acide Acétique (99.96 :0.04, v/v/v) ; b) Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (97.96 :2 :0.04, v/v/v), Phase B : Acétone/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (49.96 :50 :0.04, v/v/v) ; c) Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (97.96 :2 :0.04, v/v/v), Phase B : Acétone/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (79.96 :20 :0.04, v/v/v) ; d) Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (97.96 :2 :0.04, v/v/v), Phase B : Acétate d'éthyle/ACN/MeOH/Acide Acétique (74.96 :20 :5 :0.04, v/v/v/v). Vinj = 1 $\mu$ L, Débit : 0,8 mL/min, T° : 20°C, Concentration : 50 $\mu$ g/mL

## 2.2. Comparaison des profils des eicosanoïdes en mode gradient linéaire et gradient optimisé

Une optimisation d'un gradient en utilisant la phase mobile optimale de Kinetex ne permet pas de résoudre les difficultés de séparations d'eicosanoïdes en NP-HPLC. Même si son temps d'analyse semble plus long, le gradient linéaire sépare mieux les PG-TX (**Fig.51**). La phase

Luna NH2 qui est une phase aminopropyle, ne semble pas adaptée à la séparation des eicosanoïdes. Toutefois, nous avons retenu le profil en gradient linéaire pour le confronter aux meilleurs profils des autres colonnes.



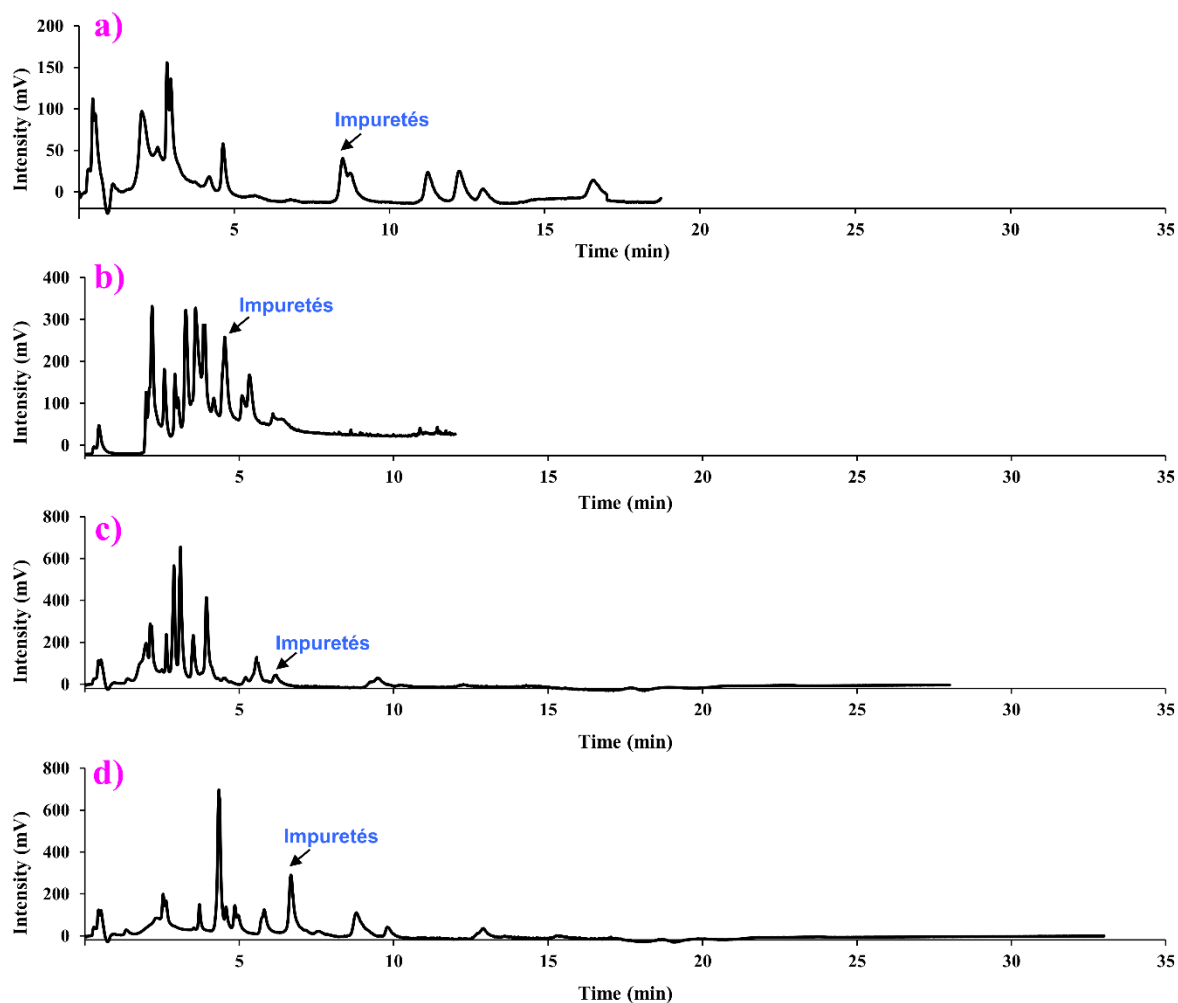
**Figure 51: Comparaison de profilage d'eicosanoïdes et précurseurs en mode gradient linéaire et optimisé sur Luna NH2.**

a) Gradient linéaire ; b) Gradient optimisé. Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (99.46 :0.5 :0.04, v/v/v), Phase B : Isooctane/Acétate d'éthyle/Isopropanol/Acide Acétique (19.96 :75 :5 :0.04, v/v/v/v). Vinj =2 $\mu$ L, Débit : 0,8 mL/min, T° : 20°C, Concentration : 50 $\mu$ g/mL

### 3. Développement et optimisation de la séparation en NP-HPLC sur Nucleosil

La **figure 52** montre les meilleurs profils obtenus sur la phase stationnaire Nucleosil. Les profils **a** et **b** de la **figure 52** montrent que ni l'isooctane, ni l'heptane en association avec l'acétate d'éthyle ou encore l'acétone ne permettent d'obtenir une sélectivité globale satisfaisante. En revanche, l'isooctane semble mieux séparer les prostanoïdes (les 4 derniers pics) avec une meilleure sélectivité (**Fig.52-a**). Les profils **c** et **d** de la **figure 52** sont respectivement les profils en gradient optimisé et linéaire avec la même phase mobile. Le profil **c** (**Fig.52**) se caractérise par une sélectivité étroite comparativement au profil **d** obtenu en gradient linéaire.





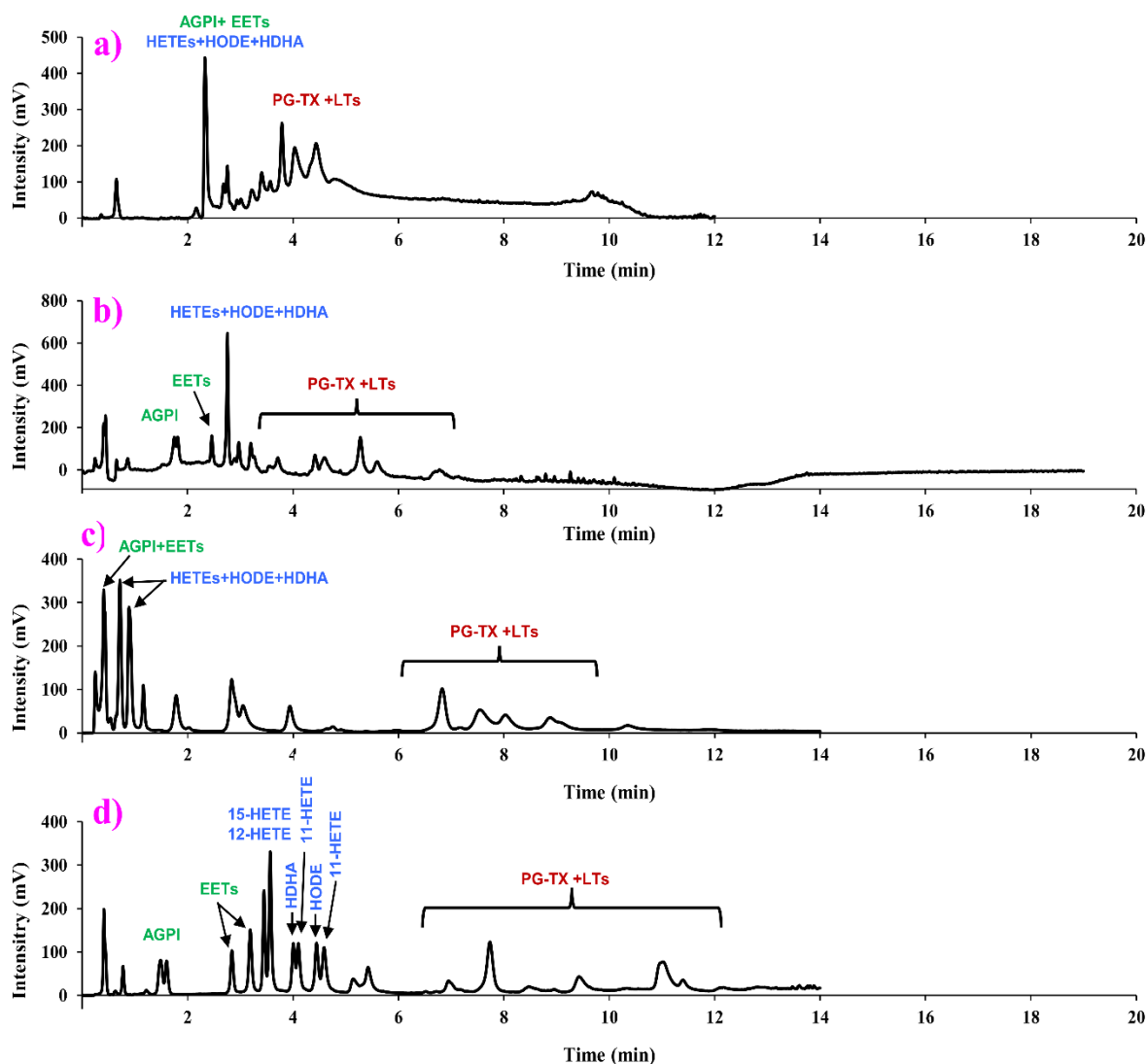
**Figure 52: Comparaison de profils de séparation d'eicosanoïdes et précurseurs sur Nucleosil.**

a), b), c) sont obtenus en mode gradient optimisé. d) en mode gradient linéaire. a) Phase A: Isooctane/Acétate Ethyle/A. Acétique (99,46: 0,5 :0,04), Phase B : Isooctane/Acétate Ethyle/A.Acétique (85: 15 :0,04%). b) Phase A: Heptane/A. Acétique (99.96 :0,04, v/v), Phase B : Acétone/acétate ethyle/A.Acétique (89.96:10 :0,04, v/v/v). c) et d) . Phase A : Isooctane/Acétate d'éthyle/Acide Acétique (99.46 :0.5 :0.04, v/v/v), Phase B : Isooctane/Acétate d'éthyle/Isopropanol/Acide Acétique (19.96 :75 :5 :0.04, v/v/v/v). Vinj =1 $\mu$ L, Débit : 0,8 mL/min, T° : 20°C, Concentration : 50 $\mu$ g/mL.

#### 4. Développement et optimisation de la séparation en NP-HPLC sur Hypersil Gold™ CN

Les mêmes optimisations de phases mobiles ont fait l'objet d'étude sur HypersilGold Cyano dont les meilleurs profils en mode gradient optimisé (**Fig.53-a et c**) et linéaire (**Fig.53-b et d**) sont rapportés ci-dessous. L'heptane associé à l'acétone (**Fig.53-a**) aboutit à un profil avec des

pics mal résolus. En réalité, nos différents tests effectués ont permis de se rendre compte que les impuretés étaient plus abondantes dans l'heptane par rapport à l'isooctane. C'est l'une des raisons pour laquelle notre développement a été principalement réalisé avec l'isooctane. En mode gradient linéaire (**Fig.53-b**), l'isopropanol semble offrir une meilleure séparation mais présente encore plusieurs co-élutions d'isomères des HETE, des EET, et des prostanoïdes. Cependant, l'isopropanol semble trop éluant en mode gradient optimisé aboutissant à des molécules (AGPI, EETs, et quelques HETEs) qui éluent presque dans le temps mort. Suivant d'autres tests réalisés, une diminution de ce pourcentage d'isopropanol permet d'augmenter légèrement la rétention mais ne semble pas améliorer la sélectivité. Le meilleur profil a été obtenu avec le mélange des trois solvants (isooctane, acétate d'éthyle et isopropanol) en phase B. Il faut préciser qu'un profil similaire est observable en mode gradient linéaire.



**Figure 53: Optimisation des profils de séparation des eicosanoïdes sur Hypersil Gold™ CN.**

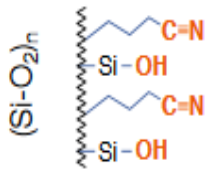
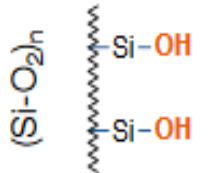
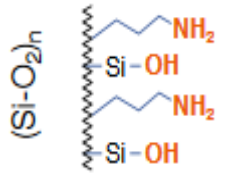
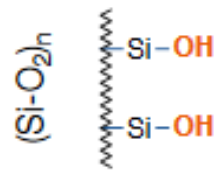
**a)** Phase A : Heptane/Acide Acétique (99,96 :0,04, v/v), Phase B : Acétone/ Acide acétique (99,96 :0,04, v/v). **b) et c)** A: Isooctane/Isopropanol/A. Acétique (99,46 :0,5 :0,04, v/v/v), Phase B: Isooctane/isopropanol/A.Acétique (84,96 :15 :0,04, v/v/v). **d)** Phase A : Isooctane/Acétate Ethyle/A. Acétique (99,46 :0,5 :0,04, v/v/v), Phase B : Isooctane/Acétate Ethyle/isopropanol/A.Acétique (20 :75 :5 :0,04, v/v/v/v). a) et c) sont obtenus en mode gradient optimisé. b) et d) sont obtenus en mode gradient linéaire.

## 5. Comparaison des profils de séparation d'eicosanoïdes obtenus sur les 4 phases stationnaires.

Par comparaison des meilleurs profils obtenus pour chaque phase stationnaire, la phase Hypersil Gold™ Cyano semble offrir la meilleure sélectivité globale. Pour des profils non montrés ici, les impuretés étaient plus retenues par certaines colonnes comme Luna NH2 que d'autres notamment Hypersil Gold™ CN.

Suivant le **tableau 13**, les phases stationnaires diffèrent entre elles sur des critères de chimie et de géométrie de particules. En revanche, il est difficile de corrélérer ou expliquer l'hétérogénéité des profils de séparation d'eicosanoïdes sur les différentes colonnes avec leurs caractéristiques. Afin d'expliquer le meilleur résultat obtenu sur Hypersil Gold™ CN, nous nous sommes penchés sur une analyse de la chimie de toutes ces phases avec les interactions qui s'y rattachent (**tableau 13**).

**Tableau 13: Résumé des phases stationnaires avec les interactions**

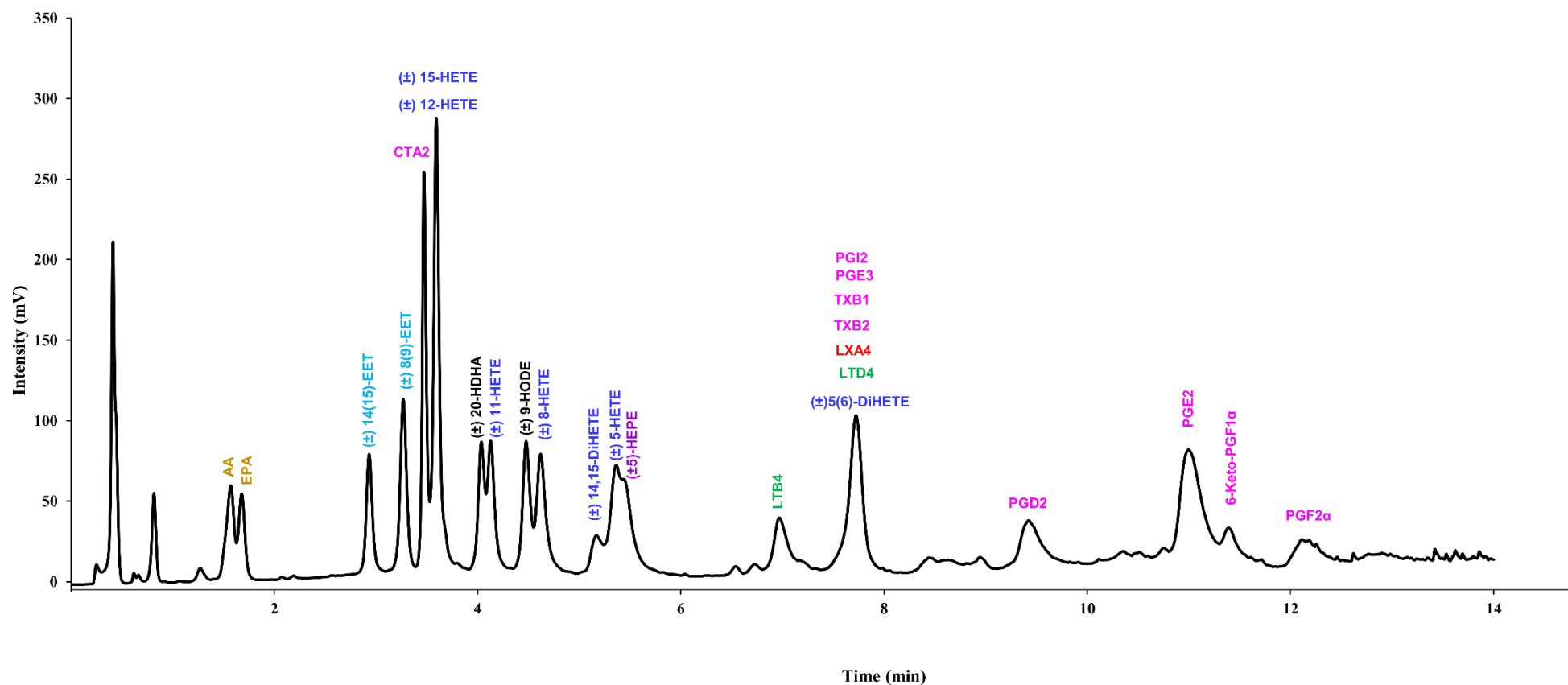
Phases stationnaires	Hypersil Gold™ CN	Kinetex	Luna NH2	Nucleosil
Chimie	Interactions d'échange d'ions et liaisons hydrogènes, Interactions hydrophobes Interactions dipolaires fortes Interactions $\pi$ - $\pi$ faibles	Interactions d'échanges d'ions et liaisons hydrogènes	Interactions d'échange d'ions et liaisons hydrogènes, Interactions hydrophobes	Interactions d'échanges d'ions et liaisons hydrogènes
Interactions possibles				

La structure des eicosanoïdes implique pour leur séparation des interactions de type hydrophobes, de type liaisons hydrogène, de type liaisons dipolaires et rarement d'échange d'ions. Même si nous sommes dans des conditions acides, il subsiste toujours des silanols résiduels susceptibles d'interagir via des interactions polaires avec les eicosanoïdes. Il en résulte une perte d'efficacité, expliquant en partie des pics larges pour la plupart des profils décrits ci-haut. Au vu de leur structure, la largeur des pics des prostanoides conforte l'existence de cette interaction polaire. Ainsi en plus des interactions hydrophobes, il y a également de fortes interactions dipolaires qui sont susceptibles d'avoir lieu avec les insaturations des eicosanoïdes.

Ce mécanisme expliquerait donc le meilleur profil de séparation obtenu sur Hypersil Gold™ CN (**Fig.53-d et 54**).

## Conclusion

Il est très rare de recourir à la NP-HPLC pour la séparation des eicosanoïdes. A ce jour et à notre connaissance, il n'existe qu'une seule méthode de séparation des eicosanoïdes en NP-HPLC qui est non seulement très longue mais aussi limitée à quelques espèces [143]. Pour cette raison, une exploration des performances de la NP-HPLC pour la séparation des eicosanoïdes a été réalisée. Nous l'avons utilisé ici pour évaluer son apport à la séparation de certains isomères et isobares co-élusés en RP-HPLC [270]. Par confrontation du profil NP-HPLC (**Fig.54**) au profil RP-HPLC (**Fig.46**), on voit par exemple que le 6-Céto PGF1 $\alpha$  et la PGI2 jamais séparés en chromatographie liquide à polarité de phases inversée le sont en chromatographie liquide à polarité de phases normale. Aussi les isobares 12-HETE et 8-HETE d'une part et 14,15-DiHETE et LTB4 d'autre part sont bien séparés en NP-HPLC. La NP-HPLC serait donc une alternative pour la séparation de certains isomères en vu de leur quantification en spectrométrie de masse. Il en résulterait une meilleure sensibilité de détection pour ces espèces co-élusés en RP-HPLC.



**Figure 54: Profilage de 24 eicosanoïdes et 2 acides gras polyinsaturés par HPLC à polarité de phases normale.**

Phase stationnaire : HypersilGold CN (100 mm x 2.1 mm x 3 µm) Phase mobile : A (Isooctane : Acétate d'Ethyle : A. acétique 99.46:0.5 :0.04, v/v/v); B(Isooctane : Acétate d'Ethyle : Isopropanol : A. acétique, 20:71:5 :0.04, v/v/v/v)). T = 20°C ; V injecté = 1µL ; Débit = 0,8mL/min

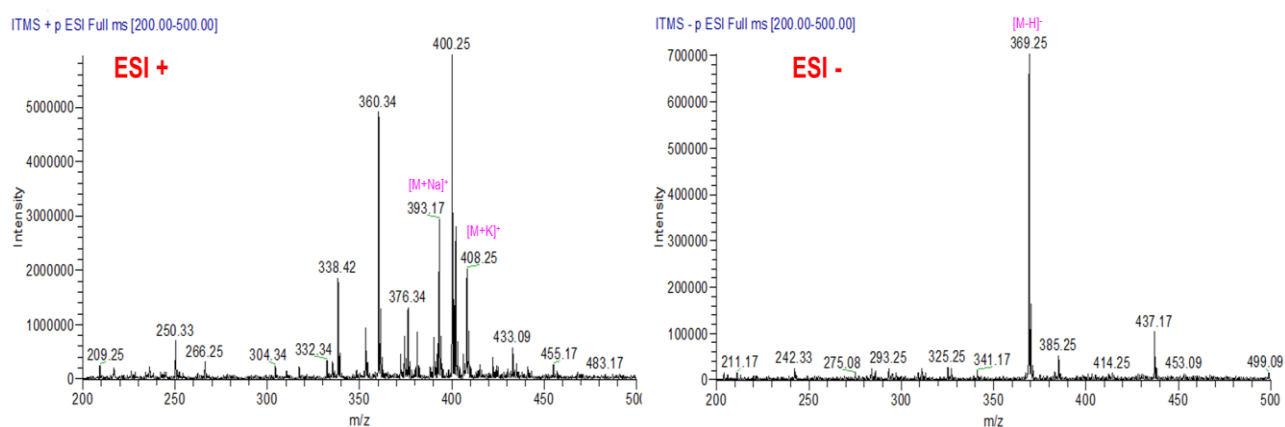
## **Chapitre 3: Développement de méthodes de détection par spectrométrie de masse**

La quantification des eicosanoïdes se fait de nos jours préférentiellement sur un triple quadripôle en ESI négatif avec le mode MRM [108,116,257,282]. Notre objectif ici est de proposer une méthode alternative d'analyse des eicosanoïdes par un LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA dans le cadre d'une approche ciblée. Ensuite, une méthode de détection sur un triple quadripôle de type LCMS-8060 en mode MRM a également été développée pour des fins d'exploration d'échantillons cellulaires pour une confrontation au profilage obtenu sur un LTQ-Orbitrap® Velos Pro (**Partie II-Chapitre 5**).

## I. Développement d'une méthode de détection sur un LTQ-Orbitrap® Velos Pro

### 1. Choix du mode d'ionisation

Nombre d'eicosanoïdes ne s'ionisent pas ou très peu en mode positif, confortant ainsi les données de la littérature [51,87,108,116] suivant laquelle le mode négatif est le plus approprié à leur analyse. A titre d'exemple, le 6 Céo-PGF1, la PGF2 $\alpha$ , la PGE2, et l'ensemble des HETEs inclus dans cette étude ne s'ionisent que très faiblement ou pas du tout en mode ESI positif. Les spectres ci-dessous (**Fig.55**) représentent les résultats d'un full scan de la TXB2 respectivement en mode ESI positif et négatif. En mode ESI positif, on note une absence du pic moléculaire et une dispersion de l'intensité du pic moléculaire sous forme d'adduits tels que Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et autres espèces moléculaires non identifiées. En revanche en mode ESI négatif, le pic moléculaire est bien intense et distinguable. Le mode ESI négatif a donc été retenu pour l'analyse des oxylipines et AGPI de notre étude.



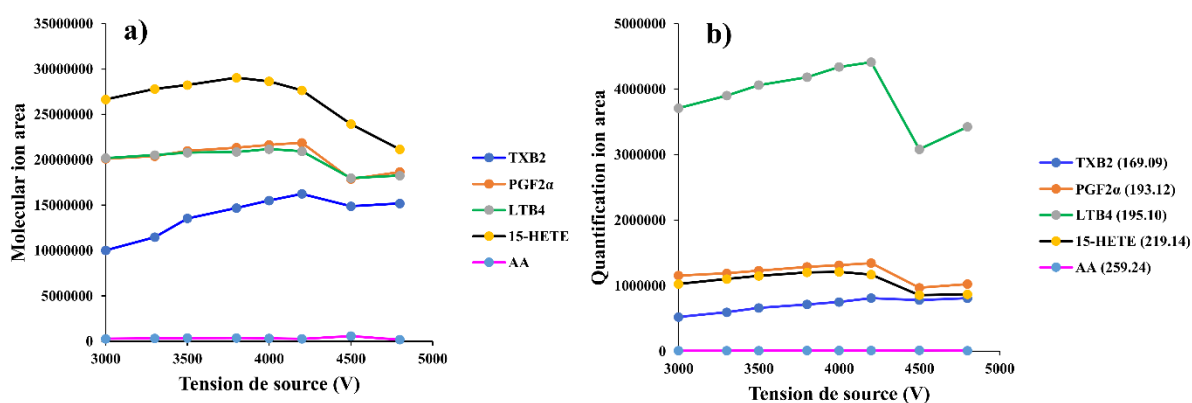
**Figure 55: Acquisition en mode full scan de la TXB2 en ESI positif et négatif sur un LTQ-Orbitrap® Velos Pro**



## 2. Les paramètres de source d'ionisation ESI

Notre méthode RP-HPLC développée avec la phase stationnaire Accucore™ C30 sur l'UHPLC Ultimate 3000 a été couplée au LTQ-Orbitrap® Velos Pro équipé d'une source HESI-II (Heated Electrospray Ionisation). Il s'agit d'une source qui permet une meilleure désolvatation, ce qui augmente la sensibilité des analyses [283]. Après un compromis sur différents paramètres de source, une optimisation de la tension de source a fait l'objet d'étude. En effet, mis à part la tension de source que nous présenterons ci-dessous (**Fig.56**), la modification des autres paramètres n'influençait pas significativement la réponse du détecteur. Ces paramètres étaient définies donc comme suit: heater temperature = 300 °C, sheath gas flow rate = 40 arb, aux gas flow rate = 20 arb, sweep gas flow rate = 0 arb, capillary temperature = 350°C, s-lens RF level = 60%. Une optimisation de la tension de source par FIA (Flow injection analysis) a été réalisée à partir de 5 molécules représentatives du profil chromatographique dans les mêmes conditions chromatographiques que celles utilisées avec la phase stationnaire Accucore™ C30 (**Fig.56**). L'analyse de la **figure 56-a** montre que toutes les molécules ne s'ionisent pas suivant la même échelle : l'acide arachidonique répond très faiblement comparé au 15-HETE. Globalement, plus la tension de la source augmente, et plus le nombre d'ions moléculaires  $[M-H]^-$  formés augmente jusqu'à un optimum avant de diminuer. La 15-HETE est la molécule qui s'ionise le mieux parmi les 5 molécules. La tension optimale d'ionisation des cinq molécules varie entre 3800 et 4200 V. Nous avons choisi 3800 V comme compromis pour deux raisons :

- En raison de sa structure, le 15-HETE se fragmente très peu pour donner l'ion spécifique à suivre pour une quantification. Il paraît donc clair qu'il faut choisir une tension permettant d'ioniser le maximum de 15-HETE pour espérer améliorer la LOD.
- La tension maximale recommandée par le fabricant du spectromètre de masse LTQ-Orbitrap® Velos Pro (ThermoFisher) est de 4200 V.



**Figure 56: Optimisation de la tension de source HESI.**

a) l'aire sous la courbe utilisée est celle de l'ion moléculaire. b) l'aire sous la courbe des ions fragments spécifiques de chaque éicosanoïde.

La diversité structurale des éicosanoïdes implique une hétérogénéité en termes de mécanisme de fragmentation. A titre d'exemple, le 15-HETE malgré son ionisation plus importante en source (**Fig.56-a**), donne un ion fragment spécifique très peu intense (**Fig.56-b**). L'inverse est vrai pour le LTB4. L'acide arachidonique a un très faible coefficient de réponse et un ion spécifique qui se résume en une perte de CO<sub>2</sub>.

Afin de suivre l'ensemble des 26 molécules avec un mode proche du MRM sur un triple quadripôle, le mode SRM au niveau de la trappe ionique a été utilisé. Pour ce faire, nous avons optimisé les énergies de collision en CID et choisi des transitions spécifiques.

### 3. Le mode SRM pour le suivi des transitions des éicosanoïdes

#### 3.1. Optimisation de l'énergie de collision et choix des transitions à suivre

La complexité et la ressemblance structurale des isomères et isobares d'éicosanoïdes impliquent des stratégies particulières pour les quantifier avec précision. La définition de transitions spécifiques à chaque éicosanoïde permet de s'assurer de la fiabilité de la quantification. A cette fin, une optimisation des énergies de collision a été réalisée et les ions à suivre par molécule ont été choisis. Les optimisations ont été réalisées par FIA dans les mêmes conditions de phase mobile que celles utilisées avec la phase stationnaire Accucore™ C30. Pour ce faire, 1  $\mu$ L de chaque standard à 50  $\mu$ g/mL a été injecté et une pompe quaternaire délivrait un solvant correspondant au pourcentage de solvant éluant pour chaque éicosanoïde. Après optimisation de l'énergie de collision dans une gamme allant de 0 à 150 eV, des transitions ont été définies après fragmentation par CID des molécules. Pour définir des transitions à suivre, il est courant

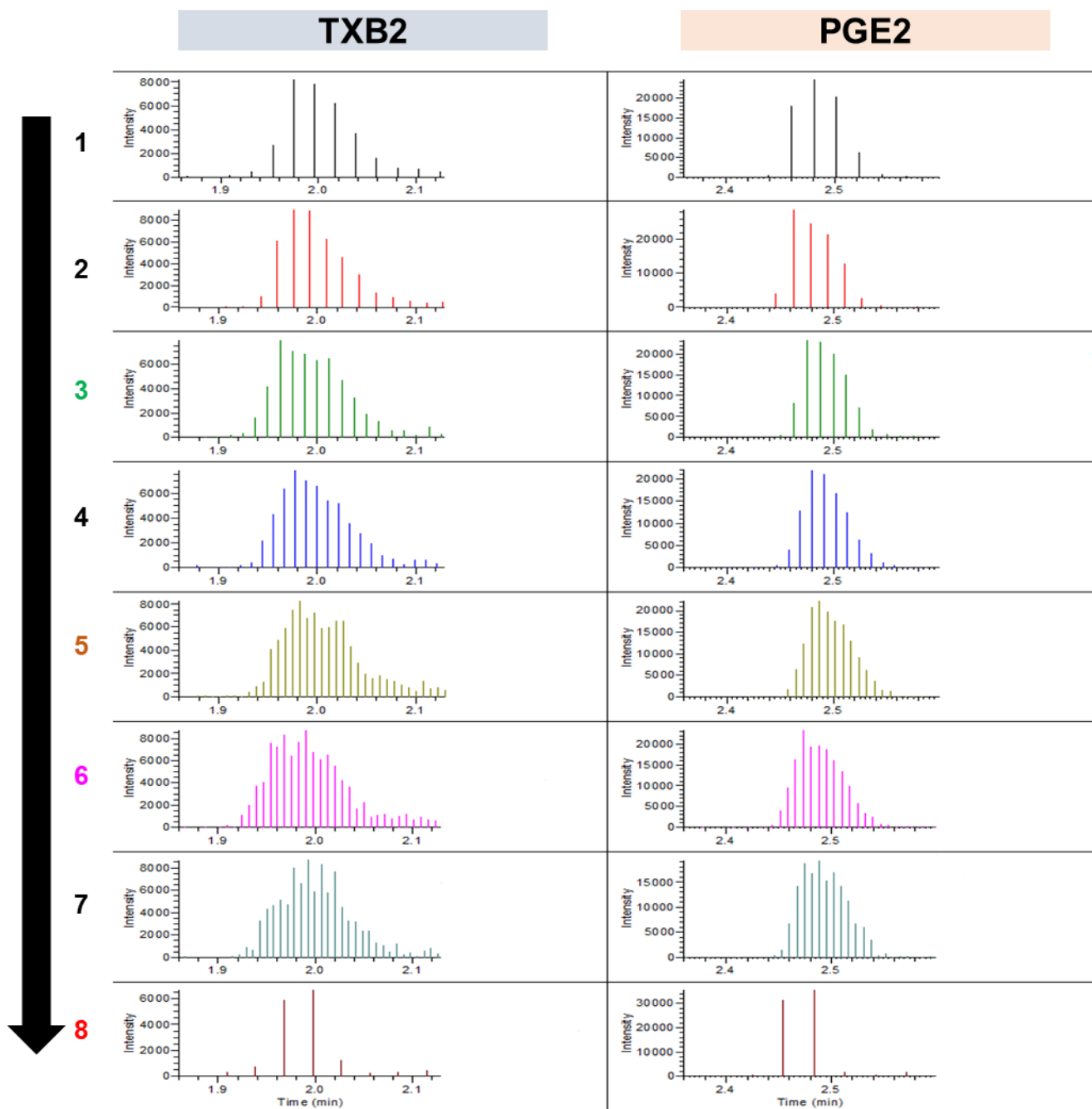
de recourir à deux ions fragments de l'ion moléculaire : l'ion d'identification ou ion de qualification et l'ion de quantification (ion spécifique). L'ion spécifique correspond à l'ion fragment spécifique issu de la fragmentation d'une molécule tandis que l'ion d'identification (non spécifique) permet de confirmer l'identité de la molécule. Dans la présente étude, l'ion d'identification est défini globalement comme une perte d'eau, ou de CO<sub>2</sub> tandis que l'ion de quantification est le fruit d'une perte d'aldéhyde ou de CO<sub>2</sub>. Un diagramme montrant l'évolution de l'intensité de l'ion d'identification (**en bleu**) par rapport à l'ion de quantification (**en orange**) en fonction des énergies de fragmentation a été effectuée pour chacune des 26 molécules (**Annexe III.1**). Les valeurs optimales d'énergie sont répertoriées dans le **tableau 14 (Page 215)**. Une énergie allant de 25 à 60 eV semble être l'énergie optimale de fragmentation des eicosanoïdes et AGPI étudiés. En général, on cherche à obtenir l'intensité de l'ion de quantification supérieure à celle de l'ion d'identification. A l'exception, de la TXB1, de la 14,15-DiHETTE, l'EPA et l'AA, la fragmentation de nos molécules quelle que soit l'énergie ne permet pas d'obtenir l'intensité optimale satisfaisante pour l'ion de quantification. Le mécanisme de fragmentation par CID (une cellule de collision) qui fonctionne en mode résonant serait à l'origine de ce phénomène. En effet, le CID fonctionne en fragmentant principalement l'ion moléculaire. Il en résulte donc des ions de quantification très peu intenses dans le cas où ces derniers proviendraient d'autres ions fragments fils.

### **3.2. Optimisation de la fréquence d'acquisition sur la trappe ionique**

Après optimisation de l'énergie de collision et définition des transitions, cette partie traite de l'impact des différents paramètres sur la fréquence d'acquisition. L'objectif ici est d'arriver à obtenir un minimum de 10 points par pic pour s'assurer d'une quantification fiable. Dans un premier temps, une investigation à partir d'un mélange de deux standards à savoir la TXB2 et la PGE2 a été menée dans le but d'obtenir un nombre de points suffisants pour définir les pics chromatographiques des ions d'intérêt. La **figure 57** représente les résultats des différentes stratégies menées. L'acquisition d'un full scan associée à un évènement MS<sup>2</sup> et le suivi de trois transitions par molécules (**Fig.57-1**) aboutit à environ 7 points (TXB2) avec une fréquence d'environ 0,78 Hertz (Hz). Ce résultat montre que le nombre de point pour définir le pic de l'ion est insuffisant et nous oriente vers une réduction progressive du nombre d'évènements à réaliser de manière synchrone. L'abandon de l'évènement MS<sup>2</sup> (**Fig.57-2**) suivi d'une modification de paramètres d'injection dans la trappe (**Fig.57-3**) sont sans effet sur la fréquence d'acquisition. Il semble donc clair qu'un nombre trop élevé d'évènements dans une même analyse se solde par une fréquence d'acquisition insuffisante. Fort de tous ces résultats, une réduction du nombre

de transitions par SRM à 2 (**Fig.57-5**) permet d'augmenter significativement la fréquence d'acquisition (~ 2,28 Hz pour TXB2) pour obtenir un nombre de point suffisant par pic (environ 24 points). L'utilisation du mode scan rapide (**Fig.57-6**) et une réduction du temps d'injection dans la trappe à 5 ms (**Fig.57-7**) ne semblent pas améliorer la vitesse d'acquisition qui est de l'ordre de 2.25 Hz. Les conditions d'acquisition à la **Figure 57-5** ont ensuite été utilisées en y ajoutant les transitions de chacune des 26 molécules (**Fig.57-8**) suivi d'une segmentation en 4 voire 6 du profil chromatographique (**Fig.57-8** et **Annexe III-3**). La fréquence maximale de l'ordre de deux spectres par seconde obtenue pour suivre deux molécules (**Fig.57-5**) passe à 0,56 Hz dans le cadre du suivi de 26 molécules. En résumé, la vitesse d'acquisition de la trappe ionique n'est pas suffisante pour suivre un grand nombre de molécules par SRM pour une quantification. Une évaluation de la sensibilité (**Annexe III.2**) effectuée en fonction de ces différentes stratégies d'acquisitions montre une perte en sensibilité qui devient significative à partir de la méthode d'acquisitions **8** (**Fig.57-8**) ayant servi à analyser l'ensemble des 26 molécules par segmentation de profil chromatographique (**Annexe III.3**).

Il nous a été donné de constater que lorsque plusieurs transitions sont à suivre de manière synchrone, certains pics ne reviennent pas à la ligne de base ou ne sont pas du tout enregistrés, montrant ainsi la limite de notre approche.



**Figure 57: Optimisation de la fréquence d'acquisition sur la trappe ionique linéaire**

Seule la transition par SRM correspondant à l'ion spécifique de chaque molécule est représentée : l'ion 169 (35 eV @CID) pour la TXB2 et 271 (60 eV @CID) pour la PGE2. Les différentes méthodes acquisitions sont détaillées comme suit : **1** : Full scan en basse résolution suivi d'un MS<sup>2</sup> et SRM (3 transitions), **2** : Full scan en basse résolution avec suivi de 3 transitions par molécules par SRM, **3** : Full scan en basse résolution + diminution du temps d'injection dans la trappe (25 ms à 10 ms) et réduction du nombre de microscans de 4 à 1 ; **4** : 3 transitions par molécules + temps d'injection à 10 ms et nombre de microscan à 1 ; **5** : mêmes conditions que précédemment avec réduction du nombre de transitions à deux par molécule ; **6** : deux transitions (SRM) par molécule avec utilisation du mode scan rapide ; **7** : deux transitions par molécule avec réduction du temps d'injection dans la trappe à 5 ms ; **8** : Réduction du nombre de transitions à 1 par molécule pour suivre l'ensemble des 26 molécules par SRM et une subdivision du profil chromatographique en 4 segments.

Au terme de ce développement au niveau de la trappe ionique, deux problèmes se dégagent : une fréquence d'acquisition insuffisante mais aussi une fragmentation par CID ne produisant pas l'ion de quantification le plus intense (**Annexe III-1**). Notre développement a donc été orienté vers une acquisition en mode DDA avec une fragmentation par HCD.

## **4. Développement d'une méthode d'analyse des eicosanoïdes par DDA**

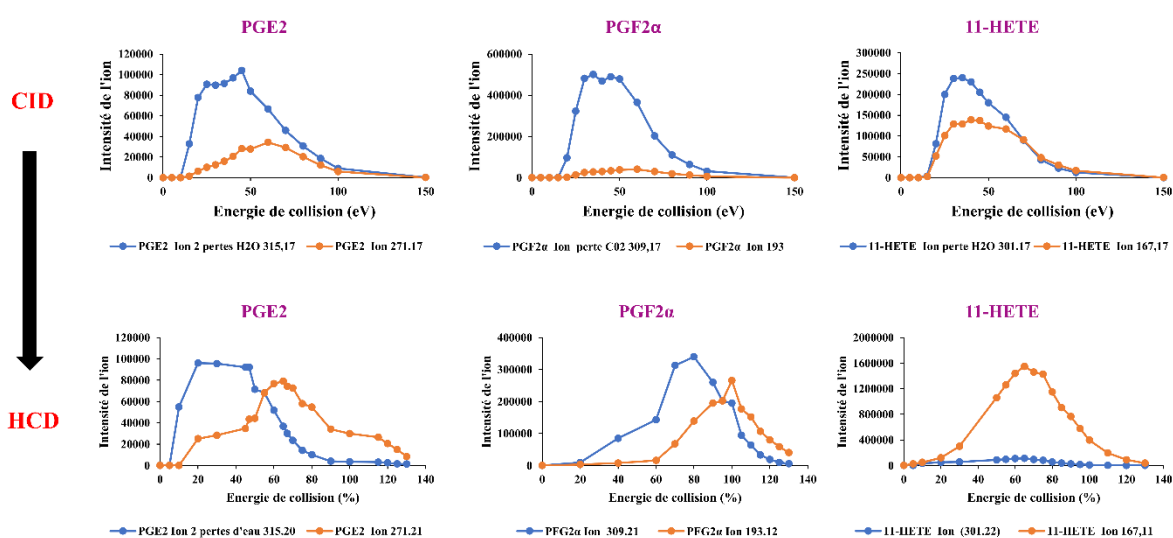
### **4.1. Optimisation de l'énergie de fragmentation par HCD**

Dans une étude combinant protéomique et lipidomique, l'énergie normalisée de fragmentation par HCD a été fixée à 30 % pour tous les eicosanoïdes pour pouvoir suivre les eicosanoïdes sur une Q Exactive Orbitrap® [253]. Cette énergie n'étant pas forcément adaptée à la fragmentation optimale de toutes les espèces moléculaires, une optimisation de l'énergie de fragmentation a été réalisée. Dans la présente étude, une fragmentation dans la gamme 0 à 130 % par HCD a été réalisée pour chaque standard par FIA. 1 µL de chaque standard (50µg/mL) a été injecté dans les mêmes conditions chromatographiques que celles développées sur Accucore™ C30. Contrairement à une fragmentation par CID, l'analyse des graphes (**Fig.58**) montre que le mécanisme de fragmentation par HCD permet une augmentation progressive de l'ion de quantification (**en orange, Fig.58**) jusqu'à atteindre son optimum avant de diminuer à nouveau. En effet, l'optimisation de l'énergie de collision par HCD permet d'obtenir l'ion de quantification (**courbe en orange, Fig.58**) plus intense par rapport à l'ion d'identification (**courbe en bleu, Fig.58**). Il est important que l'ion de quantification soit le plus abondant par rapport aux autres ions, car il conditionne la valeur du seuil de détection. Le **tableau 14** présente les énergies optimales correspondantes à l'intensité optimale pour chaque ion spécifique à suivre après fragmentation. A l'exception de la 6-Céto PGF1α et la PGI2 ; les ions spécifiques de quantification obtenus par fragmentation CID ou HCD sont identiques. La différence dans le mode d'activation par résonance du CID ou non résonnant de l'HCD expliquerait ce résultat [145,249]. Autrement dit sur l'HCD, la dissociation des ions parents donne des ions fragments issus d'ions fils, qui eux-mêmes sont le fruit de fragmentation de l'ion moléculaire. Contrairement au CID qui a lieu dans un piège à ion linéaire, la fragmentation HCD se déroule dans une cellule de collision octopolaire spécialement conçue, permettant d'augmenter l'énergie de fragmentation. Cela entraîne deux conséquences principales :

Par rapport au CID, on observe moins d'ions fragments non spécifiques sur le spectre.

De plus, on s'affranchit d'une limite inhérente au CID : le « low-mass cutoff » [284]. Ce phénomène consiste en l'absence des fragments de basse masse (inférieure à un tiers de l'ion précurseur) sur les spectres CID classiques [250]. A la différence du CID, le HCD permet donc d'observer ces fragments.

Les spectres de fragmentations de nos standards par HCD correspondant à leur énergie optimale de collision sont répertoriés à l'Annexe III-4. La nécessité de fragmenter par HCD suivant notre approche pour gagner en sensibilité est illustrée par la **figure 58** et **59**.

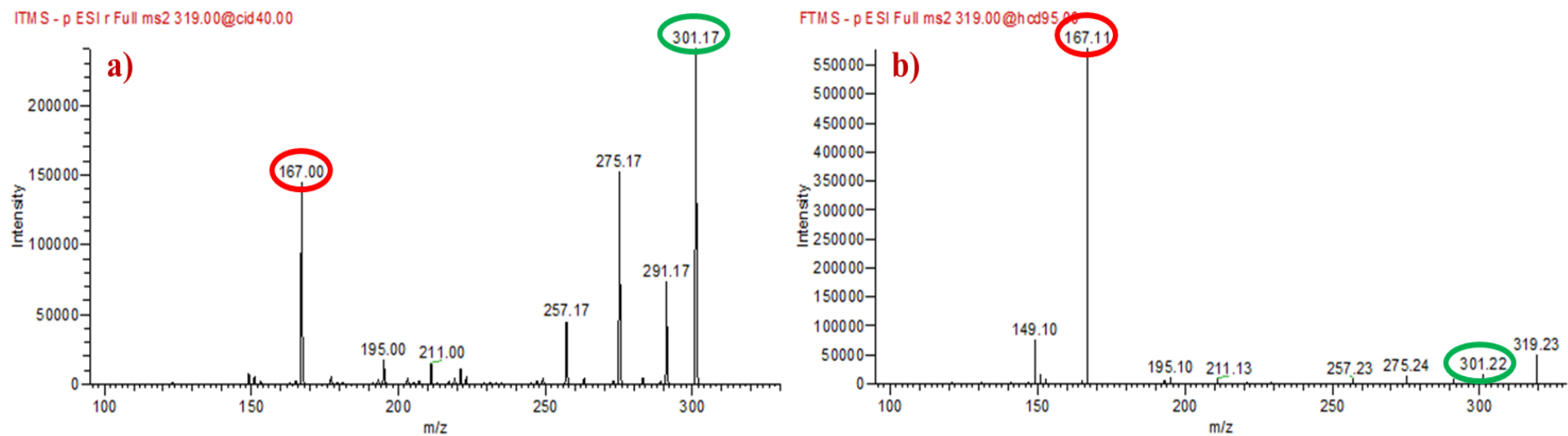


**Figure 58: Diagramme d'optimisation de l'énergie de fragmentation par CID (en haut) et par HCD (en bas) de la PGE2, la PGF2α et la 15-HETE**

Comme rapporté dans la littérature [285], des difficultés de séparation du 8-HETE et du 12-HETE ont pu être résolues au travers du suivi des ions spécifiques de chaque molécule de  $m/z$  respectivement 155.07 et 179.11. Contrairement à l'ion  $m/z$  163.11 issu de la fragmentation du 6-Céto PGF1α, notre optimisation a permis de réaliser que l'ion  $m/z$  245.19 était plus intense que  $m/z$  163.11 avec une énergie de collision de 100% par HCD (Annexe III-4). L'ion 245.19 correspond à une perte de deux molécules d'eau et deux molécules de CO<sub>2</sub>. L'ion  $m/z$  de 145.05 issu de la fragmentation du 5,6-DiHETE correspond à une perte d'une molécule de CO<sub>2</sub> suivi d'une perte d'aldéhyde de formule C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub> (2 hydroxy-pentanal) issu du clivage entre le carbone 6 et 7 (Fig.60-a). Aucune donnée de la littérature n'a décrit la fragmentation de la CTA2. Le spectre de fragmentation de la CTA2 à son énergie optimale par HCD avec un ion spécifique de  $m/z$  247.17 est rapporté dans ce travail de thèse. Cet ion correspond à une perte d'aldéhyde C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O due au clivage entre le carbone ω6 et ω7 (Fig.60-b). L'ion  $m/z$  215 (perte

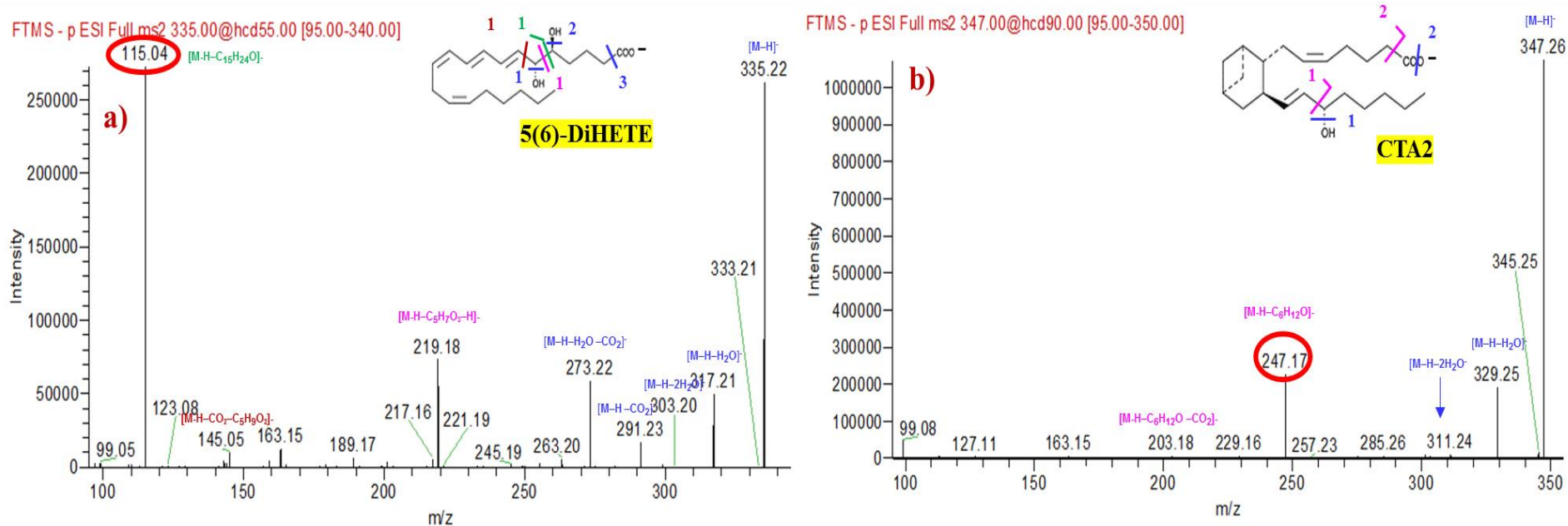
de deux molécules d'eau et d'un aldéhyde  $C_6H_{12}O$  correspondant au clivage entre le carbone  $\omega_6$  et  $\omega_7$ ) décrit en littérature [113] comme étant spécifique à la PGI2 (**Fig.61-a**) a été retrouvé sur son spectre de fragmentation par CID dans notre étude mais très peu intense sur celui issu de la fragmentation par HCD (**Fig.61-b**). La fragmentation par HCD aboutissait à un ion  $m/z$  143.07 (jamais décrit dans la littérature) correspondant à la perte d'une molécule d'eau, d'un aldéhyde  $C_6H_{12}O$  due au clivage entre le carbone  $\omega_6$  et  $\omega_7$  et un radical  $C_7H_6$  (due à la délocalisation de la double liaison en position 5) (**Fig.61-b** et **Annexe III-4**). L'ion  $m/z$  143.07 était très peu intense sur le spectre  $MS^2$  après fragmentation par CID à l'énergie optimale, montrant ainsi une différence dans la fragmentation par CID par rapport au HCD qui est plus énergétique [284].





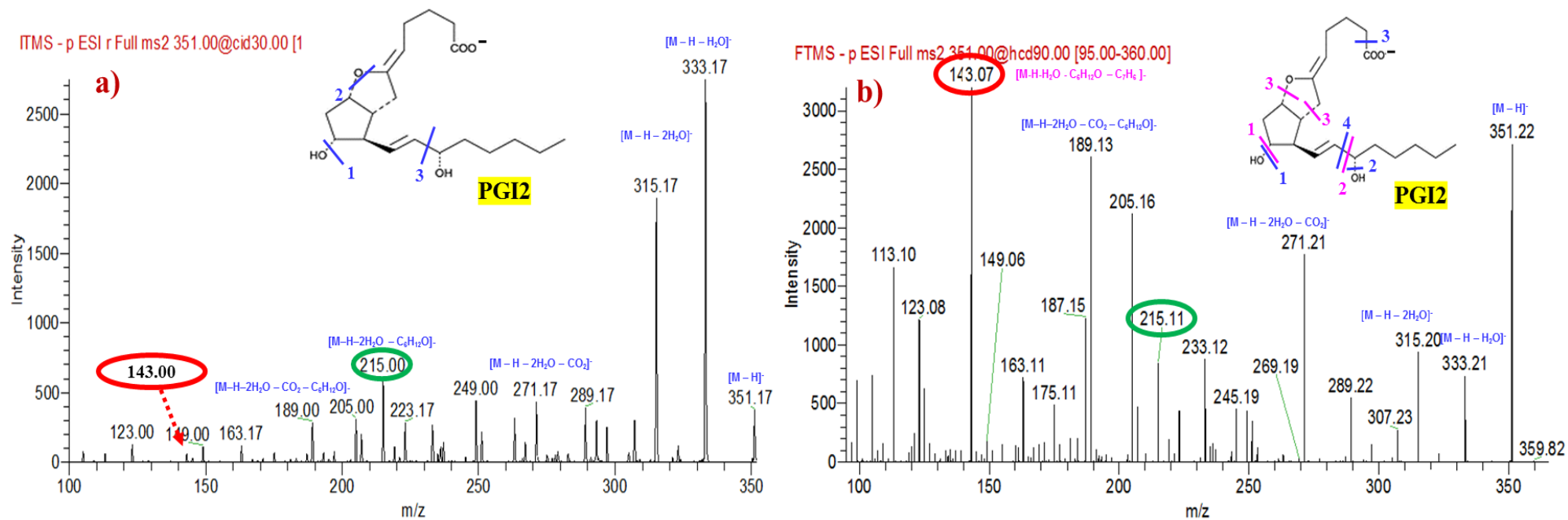
**Figure 59: Spectres de fragmentation par a) CID et par b) HCD du 11-HETE sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro.**

Les analyses ont été réalisées par FIA dans les conditions chromatographiques de phase mobile de la phase stationnaire Accucore C30. Concentration = 50 µg/mL; Vinj = 1 µL. Le spectre 59) a) a été acquis en basse résolution tandis que celui 59) b) a été acquis à une résolution de 7500.



**Figure 60: Spectres MS<sup>2</sup> issus de la fragmentation par HCD sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro**

Les spectres a) 5,6-DiHETE et b) CTA2 ont été obtenus par analyse en FIA dans les conditions chromatographiques de la phase stationnaire Accucore™ C30. Concentration = 50µg/mL ; V inj = 1 µL. Les spectres ont été acquis à une résolution de 7500.



**Figure 61: Spectres MS<sup>2</sup> issus de la fragmentation par CID (a) et par HCD (b) de la PGI2**

Les analyses ont été réalisées par FIA. Les ions issus de la fragmentation par CID ont été détectés en basse résolution à la différence de celle par HCD dtéectés en haute résolution. Les conditions chromatographiques en termes de pourcentage de phase mobile utilisée sont celles de la phase stationnaire Accucore™ C30. Concentration = 50 µg/mL ; V inj = 1 µL. Le spectre 61) a) a été acquis en basse résolution tandis que celui 61) b) a été acquis à une résolution de 7500.

**Tableau 14: Transitions et énergies optimales de fragmentation par CID et HCD des eicosanoïdes sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro.**

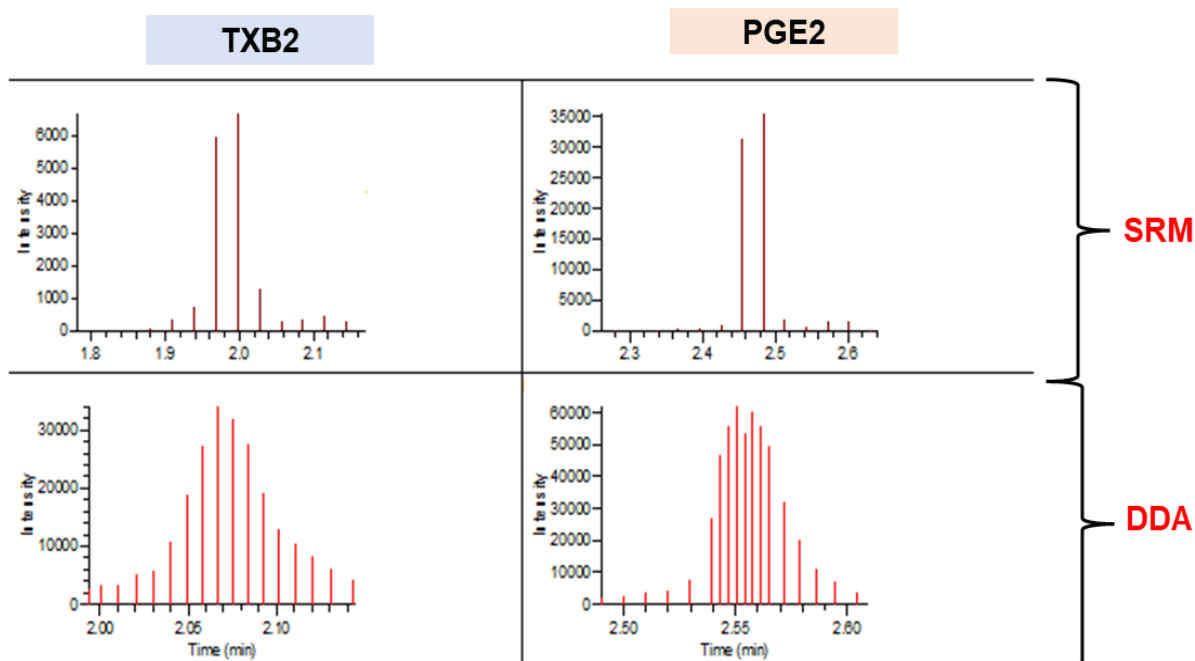
Temps de rétention (min)	Eicosanoïdes-AGPI	Formule brute	Masse (LipidsMaps)	[M-H]	CID		HCD		
					Transition	Energie de fragmentation	Ion spécifique	Energie de fragmentation	
						(eV)		(%)	eV
1.15	6-Céto-PGF1 $\alpha$	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	370.2355	369	163.11	45	245.19	100	35
1.15	PGI2	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352.225	351	215.00	30	143.07	90	31
1.83	TXB1	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	372.2512	371	171.00	60	171.10	65	22
1.98	TXB2	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	370.2355	369	169.00	35	169.09	55	19
2,21	PGE3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	350.2093	349	269.17	50	269.19	60	21
2.34	PGF2 $\alpha$	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	354.2406	353	193.00	60	193.12	95	33
2.48	PGE2	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352.225	351	271.17	60	271.21	60	21
2.58	PGD2	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352.225	351	271.17	60	271.21	60	21
2.76	LXA4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	352.225	351	115.00	25	115.04	55	19
2.88	LTD4	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	496.2607	495	177.00	25	177.03	55	19
3.49	LTB4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	336.2301	335	195.00	30	195.10	70	24
3.53	14,15-DiHETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	336.2301	335	207.00	30	207.14	70	24
3.72	5S,6R-DiHETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	336.2301	335	115.00	25	115.04	55	19
4.41	5-HEPE	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	318.2195	317	115.00	30	115.04	70	24
4.48	9-HODE	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	296.2351	295	171.00	35	171.10	75	26
4.51	20-HDHA	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	344.2351	343	241.17	50	241.20	55	19
4.6	15-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	319	219.00	40	219.14	60	21
4.71	11-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	319	167.00	40	167.11	85	29
4.79	12-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	319	179.00	30	179.11	70	24
4.83	8-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	319	155.00	30	155.07	75	26
4.9	5-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	319	115.00	30	115.04	75	26
5.13	14,15-EET	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	319	219.00	30	219.14	60	21
5.24	CTA2	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	348.5	347	247.17	40	247.17	90	31
5.35	8,9-EET	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	320.2351	319	155.00	25	155.07	65	22
5.81	EPA	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	302.2246	301	257.17	30	257.23	50	17
6.26	AA	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	304.2402	303	259.17	30	259.24	50	17

## 4.2. Le mode DDA pour le suivi des eicosanoïdes

Pour l'analyse par DDA, l'ensemble des ions quasi moléculaires  $[M-H]^-$  des molécules d'intérêt a été rassemblé dans une liste d'ions à fragmenter (liste d'inclusion). L'énergie spécifique de fragmentation a été ajoutée à la liste. L'analyse des isomères et isobares d'eicosanoïdes est complexe du fait que certains partagent la même transition ou répondent très peu en présence d'un autre isomère. C'est le cas par exemple de la PGE2-PGD2, de la 14,15-DiHETE et 5,6-DiHETE, et des molécules ayant un  $m/z$  de 319. Pour pallier ce problème, trois stratégies ont permis d'améliorer les analyses :

- Une segmentation du profil chromatographique : deux colonnes dans la liste d'inclusion ont permis de préciser le temps de début et la fin du pic chromatographique. Il est important de préciser que tous les « segments » définis sur le profil chromatographique ont tous été analysés dans un même évènement (**Annexe III-5**) contrairement à la segmentation utilisée pendant les expérimentations en mode SRM (**Annexe III-3**). En effet pour un gain en fréquence d'acquisition en mode SRM, plusieurs évènements (chaque molécule est analysée dans un seul évènement) sont regroupés sous un seul segment, ce qui aboutit à plusieurs segments (4 à 6 dans notre cas) pour prendre en compte tout le profil chromatographique.
- Une énergie commune de fragmentation par HCD (80%) a été attribuée pour les isomères de  $m/z$  319 pour s'affranchir de problèmes de pics chromatographiques incomplètement balayés.
- Enfin, lorsque cela est possible, un regroupement d'isomères et d'isobares dans un même segment a été réalisé permettant ainsi d'améliorer la fréquence d'acquisition pour obtenir un nombre de points suffisant pour définir les pics. C'est le cas du LTB4 et 14,15-DiHETE qui sont mal résolus, des HETE du fait qu'ils ont des énergies de fragmentations relativement proches (**Tableau 14**).

L'ensemble de ces approches combinées a permis d'atteindre une vitesse de balayage d'environ 2 Hz (soit deux spectres par seconde pour TXB2, **Fig.62**) pour une analyse de l'ensemble des 26 molécules contrairement au mode SRM (**Fig.57-8**) où une fréquence 0,56 Hz a été enregistrée.



**Figure 62: Analyse d'eicosanoïdes par SRM et DDA.**

Un mélange des 26 molécules avec segmentation du profil chromatographique a été analysé pour les deux modes d'acquisitions : SRM et DDA. Les chromatogrammes correspondant au TXB2 et PGE2 ont ensuite été extraits. Le chromatogramme du SRM a été acquis en basse résolution et la DDA en haute résolution 7500.

En plus des différents paramètres évoqués ci-dessus, à savoir l'utilisation d'une liste d'ions parents avec segmentation du profil chromatographique et des énergies optimales de collision, la fenêtre d'isolement pour qu'un ion soit pris en compte et fragmenté a été fixée à 1 uma. Globalement, l'acquisition en spectrométrie de masse a été réalisée en mode full scan en basse résolution dans une gamme de  $m/z$  allant de 230 à 500, suivi d'une fragmentation par HCD des deux ions les plus intenses dès qu'ils dépassent un seuil fixe. Les ions fragments obtenus sont ensuite détectés en haute résolution à une résolution de 7500 (pour  $m/z$  de 200). Une augmentation du nombre d'ions les plus intenses à fragmenter au-delà de deux n'a pas permis d'améliorer la sensibilité. Au contraire, l'augmentation du nombre d'ions le plus intense à fragmenter s'est soldé par une diminution de la fréquence d'acquisition dans la mesure où un événement supplémentaire s'ajoute dans la méthode.

Quelques difficultés issues de l'analyse en mode DDA sans segmentation du profil chromatographique peuvent être répertoriés dans ce travail. Des ions incomplètement balayés c'est à dire des pics qui ne reviennent pas à la ligne de base ou dont le début du pic manque (TXB1, TXB2, PGE3, LTD4, 20-HDHA, HETEs) ont été observés. Certains isomères donnent

des pics informatifs à la différence d'autres qui ne doivent leur présence qu'à des pseudo-pics noyés dans le bruit de fond (**Annexe III-6**).

La segmentation du profil chromatographique a permis de gagner en fréquence d'acquisition mais aussi en sensibilité (Cas du 5,6-DiHETE dont l'intensité absolue est affichée sur la **Fig.63**). Elle a enfin permis de suivre l'ensemble des ions comparativement au mode DDA sans segmentation (PGI2 et PGD2 non détectée avec le mode DDA sans segmentation (**Fig.63** et **Annexe III-6**). A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature de méthode d'analyse des eicosanoïdes en mode DDA avec segmentation du profil LC tel que réalisé ici.

Malgré la segmentation ayant permis de regrouper la PGE2 et la PGD2 dans un même segment, la PGD2 est très peu détectée (**Fig.64-b**). La réponse des deux espèces PGE2 et PGD2 en full scan et après fragmentation a donc été étudiée. Le full scan d'un mélange des deux isobares PGE2 et PGD2 (**Fig.64-a**) montre des profils comparables en termes d'intensité. La fragmentation des deux espèces injectées isolément (**Fig.64-c et d**) montre qu'en réalité la PGD2 est très peu fragmentée malgré le fait que l'énergie de collision utilisée lui soit spécifique. L'ion spécifique majoritaire issu de la fragmentation de la PGD2 est celui de m/z de 289.22 correspondant à une perte d'eau et de CO<sub>2</sub>. Ce défaut de fragmentation de la PGD2 n'a pas pu être expliqué. Le full scan de l'ion moléculaire de la PGD2 a permis d'écarter tout problème de dégradation éventuel. L'ion de m/z de 289.22 en plus du temps de rétention de la PGD2 a été utilisé pour suivre la PGD2 dans les échantillons cellulaires.

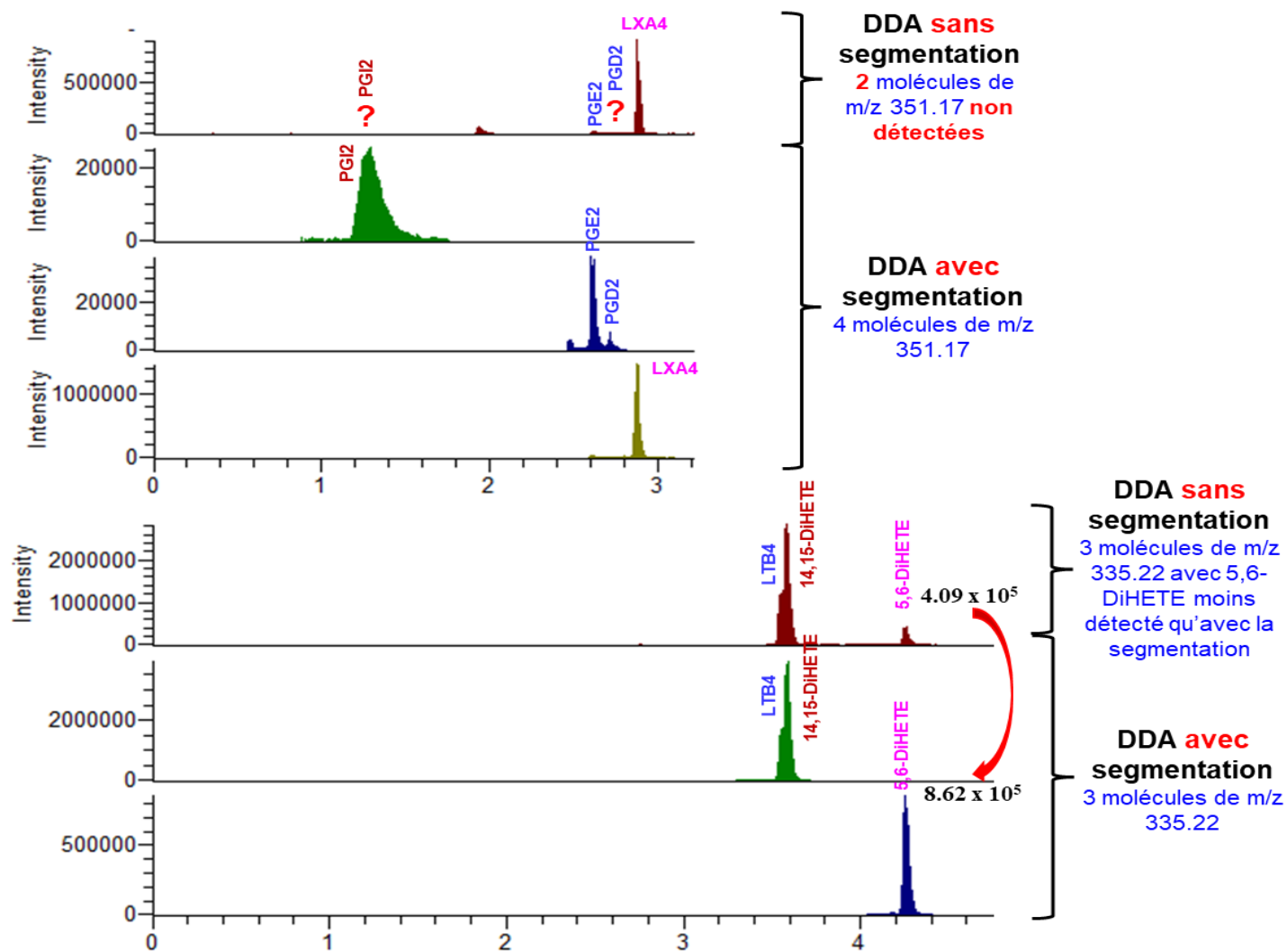
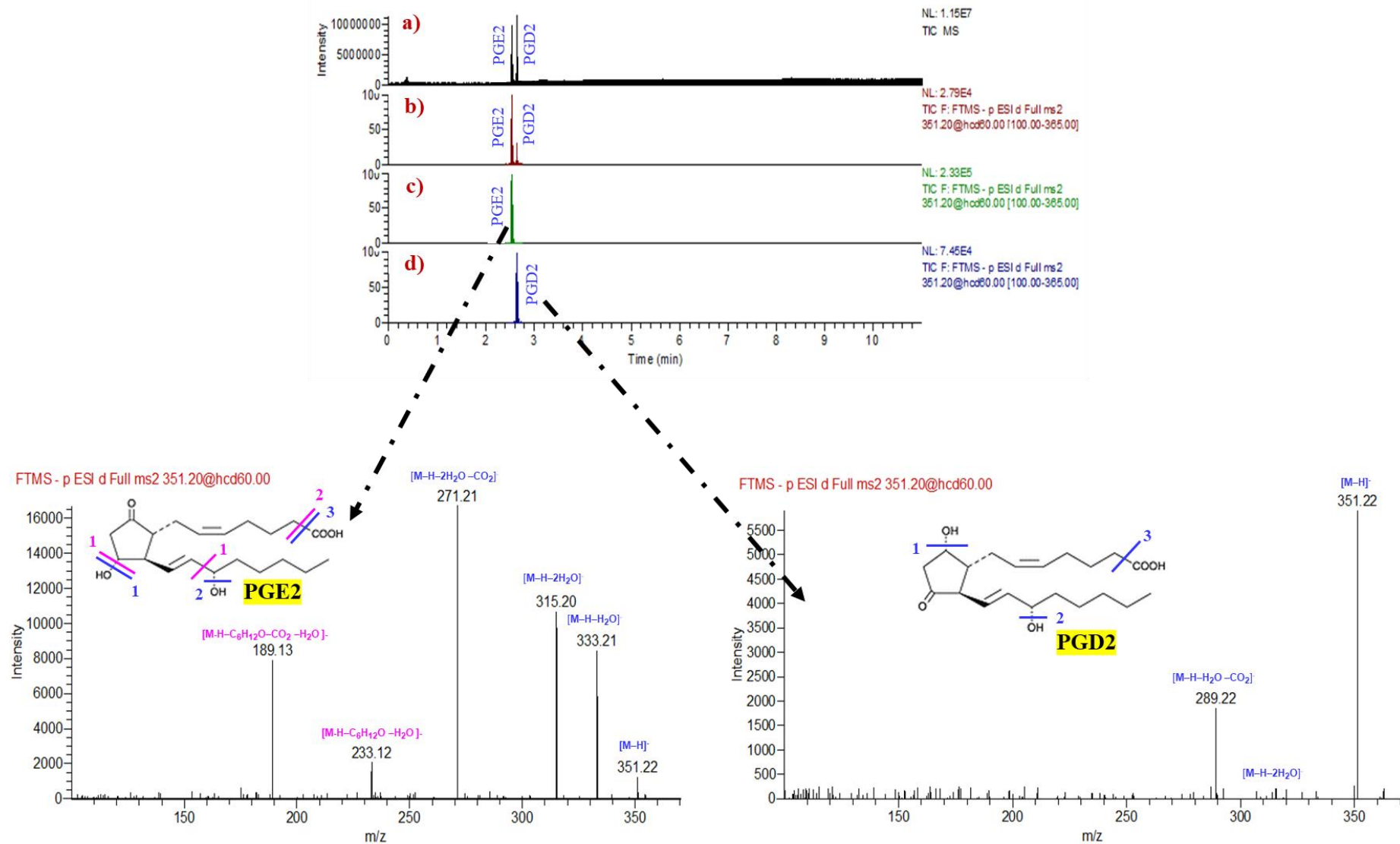


Figure 63: Influence de la segmentation du profil chromatographique sur la détection de certains isobares et isomères sur un LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA segmenté.





**Figure 64: Illustration des spectres de fragmentation de la PGE2 et la PGD2.**

Les analyses ont été faites en RP-HPLC-MS/MS en mode DDA avec segmentation du profil chromatographique. Phase stationnaire : Accucore™ C30 (100 X 2.1 mm, 2.6µm). Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 2µL ; Débit = 0,5 mL/min. a) correspond au courant ionique total (TIC) d'un mélange de PGE2 et PGD2 à 50 µg/mL ; b) TIC issu de la fragmentation à 60% par HCD d'un mélange PGE2 et PGD2 à 50 µg/mL ; c) TIC de la fragmentation à 60% par HCD de la PGE2 à 50µg/m injecté tout seul ; d) TIC de la fragmentation à 60% par HCD de la PGD2 à 50µg/m injecté tout seul. Les spectres MS<sup>2</sup> ont été acquis à une résolution de 7500.

## 5. Validation de la méthode

Au vu de ce qui précède, le mode DDA avec segmentation du profil LC a permis de suivre l'ensemble des 26 molécules. Après acquisition, les ions de quantification sont extraits grâce à l'algorithme Genesis disponible sur X-Calibur™. Notre méthode a été validée en termes de sélectivité, de limite de détection, de linéarité, d'exactitude et de précision intra et inter-jour.

### 5.1. La sélectivité et la limite de détection

#### 5.1.1. La sélectivité

La sélectivité d'une méthode quantitative est la capacité d'une méthode à mesurer un analyte dans un échantillon sans que cette mesure ne soit faussée par d'autres composants de l'échantillon [286–288]. Un manque de sélectivité peut être dû, par exemple, à des effets de matrice, des interférences spectrales ou des recouvrements de pics en chromatographie. Afin d'évaluer la sélectivité de notre méthode, 900 µL de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec de l'albumine et des antibiotiques et surchargé avec 100µL d'un mélange des 26 standards à 100 ng/mL a été soumis à une extraction par SPE. Cette procédure a ensuite été réalisée 5 fois pour évaluer la sélectivité de notre méthode. Le coefficient de variation (CV) du rapport de l'intensité de l'ion de quantification par rapport à l'intensité de l'ion de qualification a ensuite été calculé (**Annexe III-7**). Suivant ces résultats, le coefficient de variation du ratio ion de quantification/ion de qualification de chaque ion est inférieur à 10% à l'exception de la PGD2 (15,51 %), respectant ainsi les seuils tolérés de validation de méthodes bioanalytiques [148,286,289].

#### 5.1.2. La limite de détection et la limite de quantification

A partir d'un mélange des 26 molécules à 2 µg/mL, une dilution en cascade a été réalisée jusqu'à atteindre une solution à 0,01 pg/mL. Chacune des solutions a ensuite été injectée trois fois et analysée par RP-HPLC-LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA avec segmentation du profil LC. La limite de détection (LOD) a été définie comme étant trois fois le rapport signal sur bruit. La limite de quantification (LOQ) a été définie comme étant 10 fois le rapport signal sur bruit. Les données sont répertoriées dans le **tableau 15**. Des limites de détection évaluées sont de l'ordre de 2 pg pour certains prostanoides, de 0,5 pg pour les leucotriènes et de 0.02 à 2 pg pour les HETEs et 15 pg pour certaines espèces oxydées comme le 5,6-DiHETE. Ces LOD sont équivalentes à d'autres retrouvées dans la littérature et développées sur un triple quadripôle ou une QTRAP [65,107,133,149], voire meilleures pour quelques molécules. En effet, la LOD de notre méthode est 2 à 10 fois plus faible pour la détection des HETEs, le 6-Céto PGF1α

[140,285,290,291], la PGF2 $\alpha$  et les HODEs que celle développée sur un triple quadripôle dans les travaux de Levison, *et al.* [290] et de Wang, *et al.* [291]. Aussi, notre LOD est plus faible que celle développée en mode MRM sur un triple quadripôle pour la détection et la quantification d'isoprostanes [81]. Globalement, des LOQ de l'ordre du pg ont également pu être atteinte et permettront de mesurer les eicosanoïdes de nos échantillons cellulaires.

## 5.2. Domaine de linéarité

Sur 7 étalons internes obtenus auprès de Cayman Chemistry (6-Céto-PGF1 $\alpha$ -D4 ; TXB2-D4 ; PGE2-D4 ; LTB4-D4 ; 15(S)-HETE-D8 ; ( $\pm$ )8(9)-EET-d11 ; EPA-D5), trois ont été retenus (6-Céto PGF1 $\alpha$ -D4 ; LTB4-D4 ; 15(S)-HETE-D8) pour la quantification. Ces choix ont été fait sur la base de certains critères spécifiques à notre étude. Comme évoqué plus haut (**Partie II- Chapitre 3, I-4.2**), le suivi des molécules de notre mélange complexe sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro se confronte à un problème de fréquence d'acquisition. L'ajout d'étalons internes dans la méthode implique un nombre plus important de molécules à suivre, qui se soldera par une fréquence d'acquisition insuffisante. Il en résulterait des pics de molécules incomplètement balayés. Pour toutes ces raisons, nous avons restreint le nombre d'étalons interne à raison d'un étalon interne par famille d'eicosanoïdes (soit trois étalons internes). A cela, il est important de préciser que certains étalons internes tels que le ( $\pm$ )8(9)-EET-d11 et l'EPA-D5 répondent très mal et se fragmentent très peu au cours de nos analyses.

Des courbes d'étalonnages ont été réalisées à partir de 8 niveaux de quantité correspondant respectivement à 2.5 ; 12.5 ; 25 ; 125 ; 250 ; 1250 ; 2500 et 12500 pg (quantité injectée sur colonne). A chaque point de gamme, il y a été ajouté 125 pg (quantité sur colonne) d'un mélange d'étalons internes (6-Céto-PGF1 $\alpha$ -D4 ; LTB4-D4 ; 15(S)-HETE-D8). Les rapports de surface de l'ion de quantification de chaque molécule par rapport à la surface de l'ion spécifique de l'étalon interne ont permis de réaliser les courbes d'étalonnage (**Annexe III-8**). L'évaluation des facteurs de pondération (égal, 1/X, 1/X<sup>2</sup>, 1/Y, 1/Y<sup>2</sup>) appliqués à chacune de nos courbes a permis de choisir le facteur de pondération « égal » qui a permis d'obtenir des coefficients de corrélations « R<sup>2</sup> » compris entre 0.9951 (15-HETE) et 0.9999 (6-Céto-PGF1 $\alpha$ ) sauf pour la PGD2 avec un R<sup>2</sup> de l'ordre 0.9877. Un domaine de linéarité allant de 2,5 à 12500 pg a pu être obtenu pour la plupart des eicosanoïdes à l'exception de quelques-uns (PGD2 ; 14,15-EET ; AA ; EPA). Les résultats sont rapportés dans le **tableau 15**. Les courbes d'étalonnage regroupées en **Annexe III-8** montrent une linéarité dans les domaines étudiés (**tableau 15**).

**Tableau 15: Résultats de validation : Limite de détection et linéarité**

Tr (min)	Eicosanoïdes-AGPI	Ion spécifique	LOD (pg)	LOQ (pg)	Etalon interne	Linéarité (pg)	Equation	R <sup>2</sup>
1.44	6-Céto-PGF1 $\alpha$	245.19	1	3.3	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	2.5-12500	Y = 0.94+0.018*X	0.9999
1.45	PGI2	143.07	100	666.7	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	--	--	--
2.11	TXB1	171.1	50	166.7	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	25-12500	Y = 0.0013+0.00013*X	0.9998
2.21	TXB2	169.09	35	116.7	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	25-12500	Y = 0.0013+0.00014*X	0.9992
2.29	PGE3	269.19	35	116.7	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	25-12500	Y = -0.0052+0.00013*X	0.9989
2.45	PGF2 $\alpha$	193.12	2	6.7	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	2.5-12500	Y = 0.28+0.0027*X	0.9986
2.57	PGE2	271.21	20	66.7	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	2.5-12500	Y = 0.0013+0.00014*X	0.9992
2.68	PGD2	271.21	250	833.3	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	250-12500	Y = -0.013+1.47e-005*X	0.9993
2.83	LXA4	115.04	1	3.3	6-Céto- PGF1 $\alpha$ -D4	2.5-12500	Y = 0.20+0.0027*X	0.9975
2.91	LTD4	177.03	0.5	1.7	LTB4-D4	2.5-12500	Y = 0.052+0.0033*X	0.9985
3.49	LTB4	195.1	0.5	1.7	LTB4-D4	2.5-12500	Y = 1.17+0.0080*X	0.9979
3.53	14,15-DiHETE	207.14	0.02	0.1	LTB4-D4	2.5-12500	Y = 0.61+0.027*X	0.9998
3.75	5,6-DiHETE	115.04	10	33.3	LTB4-D4	2.5-12500	Y = 0.0047+0.00044*X	0.9972
4.51	5-HEPE	115.04	2	6.7	LTB4-D4	2.5-12500	Y = 0.042+0.0016*X	0.9992
4.58	13-HODE	195.14	0.5	1.7	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.50+0.0057*X	0.9958
4.6	9-HODE	171.1	0.5	1.7	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.37+0.0032*X	0.9978
4.63	20-HDHA	241.2	5	16.7	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.075+0.00087*X	0.9994
4.71	15-HETE	219.14	2	6.7	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.11+0.0016*X	0.9951
4.81	11-HETE	167.11	0.2	0.7	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.44+0.014*X	0.9998
4.9	8-HETE	155.07	1.5	5.0	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.32+0.0023*X	0.9978
4.91	12-HETE	179.11	1.5	5.0	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.20+0.0030*X	0.9993
5.02	5-HETE	115.03	1.5	5.0	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.13+0.0026*X	0.999
5.25	14,15-EET	219.14	50	166.7	15(S)-HETE-D8	125-25000	Y = 0.0030+0.00018*X	0.9977
5.37	CTA2	247.17	0.5	1.7	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.24+0.0060*X	0.9997
5.47	8,9-EET	155.07	15	50.0	15(S)-HETE-D8	2.5-12500	Y = 0.011+0.00025*X	0.9996
5.94	EPA	257.23	100	333.3	15(S)-HETE-D8	125-25000	Y = -0.0041+2.71e-005*X	0.9984
6.41	AA	259.24	100	333.3	15(S)-HETE-D8	125-25000	Y = 0.0016+1.61e-005*X	0.9966

### 5.3. L'exactitude et la précision

L'exactitude et la précision intra-jour et inter-jour ont été évaluées pour deux niveaux de quantités en calculant le coefficient de variation du rapport de l'aire sous la courbe entre l'ion de quantification de chaque molécule et l'ion spécifique de l'étalon interne.

L'exactitude et la précision intra-jour ont été obtenues par analyse de trois échantillons préparés le même jour puis injectés en triplicat. Trois séries de préparations par jour pendant 3 jours (soit au total 9 échantillons) puis injectés 3 fois chacun ont permis d'évaluer l'exactitude et la précision inter-jour. L'exactitude a été exprimée en pourcentage de la quantité expérimentale par rapport à la quantité vraie ou absolue attendue. En revanche, un coefficient de variation (CV) a permis d'évaluer la précision de notre la méthode.

Globalement, l'exactitude intra-jour de notre méthode (**Tableau 16**) est comprise entre 88.70% (9-HODE) – 113.12% (LXA4) pour le premier niveau de quantité et entre 86.56% (15-HETE) – 103.52% (TXB1) pour le niveau 12500 pg. Une valeur moyenne d'exactitude intra-jour de mesure de toutes les molécules de l'étude est de l'ordre de 106% pour le premier niveau de quantité et de 97% pour le deuxième niveau. L'exactitude inter-jour est comprise entre 89.66% et 116%. En revanche, notre méthode est relativement moins exacte pour la mesure de la PGD2 du fait de son instabilité et des difficultés à le suivre et l'EPA du fait de son faible coefficient de réponse en source. Ces valeurs d'exactitudes respectent globalement les normes de validations de méthodes bioanalytiques de l'EMA (European Medicines Agency) [289] dans la mesure où elles sont dans une fenêtre de 15% par rapport à la valeur réelle attendue.

Les résultats (**Tableau 17**) montrent une précision intra-jour avec un coefficient de variation inférieur ou égal à 10% (13-HODE) pour une quantité de 250 pg et inférieur ou égale à 5% (20-HDHA) pour le deuxième niveau de quantité équivalent à 12500 pg. L'analyse de l'ensemble des résultats de la précision inter-jour montre un CV inférieur à 15% indépendamment du niveau de quantité. En somme, notre méthode est en accord avec les recommandations de validation de méthodes bioanalytiques de l'agence européenne du médicament [289]. Suivant la norme de l'agence européenne du médicament, une méthode est précise si le CV est inférieur à 15%.

**Tableau 16: Résultats de validation ( Exactitude intra et inter-jour)**

Temps de Retention (min)	Eicosanoïdes-AGPI	Niveau 1			Niveau 2		
		Quantité (pg)	Exactitude intra-jour (% , n=3)	Exactitude inter-jour (% , n=9)	Quantité (pg)	Exactitude intra-jour (% , n=3)	Exactitude inter-jour (% , n=9)
<b>1.44</b>	6-Céto-PGF1 $\alpha$	250	109.78	109.23	12500	96.96	98.63
<b>1.45</b>	PGI2	250	---	---	12500	---	---
<b>2.11</b>	TXB1	250	93.36	100.67	12500	103.52	103.52
<b>2.21</b>	TXB2	250	96.84	100.62	12500	92.40	94.00
<b>2.29</b>	PGE3	250	102.74	94.27	12500	97.09	98.58
<b>2.45</b>	PGF2 $\alpha$	250	99.40	99.53	12500	94.50	96.39
<b>2.57</b>	PGE2	250	118.86	107.59	12500	94.10	96.81
<b>2.68</b>	PGD2	250	121.78	131.57	12500	104.67	112.93
<b>2.83</b>	LXA4	250	113.12	108.95	12500	102.69	100.83
<b>2.91</b>	LTD4	250	108.37	114.93	12500	95.77	97.32
<b>3.49</b>	LTB4	250	95.98	94.56	12500	99.82	100.56
<b>3.53</b>	14,15-DiHETE	250	105.82	105.16	12500	96.58	98.31
<b>3.75</b>	5,6-DiHETE	250	112.22	113.20	12500	99.41	101.29
<b>4.51</b>	5-HEPE	250	105.85	107.02	12500	93.60	97.11
<b>4.58</b>	13-HODE	2500	114.98	116.16	12500	105.66	101.37
<b>4.6</b>	9-HODE	250	88.70	89.66	12500	102.97	102.13
<b>4.63</b>	20-HDHA	2500	109.76	103.79	12500	97.96	98.76
<b>4.71</b>	15-HETE	2500	111.90	112.90	12500	86.56	93.19
<b>4.81</b>	11-HETE	250	104.61	104.66	12500	95.73	96.41
<b>4.9</b>	8-HETE	250	93.40	94.57	12500	98.12	100.48
<b>4.91</b>	12-HETE	250	99.49	99.54	12500	99.49	100.24
<b>5.02</b>	5-HETE	250	105.53	104.84	12500	96.98	97.69
<b>5.25</b>	14,15-EET	250	106.78	108.62	12500	98.42	97.94
<b>5.37</b>	CTA2	250	105.19	106.15	12500	99.47	100.70
<b>5.47</b>	8,9-EET	250	105.31	106.87	12500	98.10	98.82
<b>5.94</b>	EPA	250	133.38	126.05	12500	95.15	97.95
<b>6.41</b>	AA	1250	104.95	104.12	12500	95.88	99.66

**Tableau 17: Résultats de validation ( Précision intra et inter-jour)**

Temps de Retention (min)	Eicosanoïdes-AGPI	Niveau 1			Niveau 2		
		Quantité (pg)	Précision intra-jour (%CV, n=3)	Précision inter-jour (%CV, n=9)	Quantité (pg)	Précision intra-jour (%CV, n=3)	Précision inter-jour (%CV, n=9)
1.44	6-Céto-PGF1 $\alpha$	250	1.14	7.19	12500	2.12	2.30
1.45	PGI2	250	---	---	12500	---	---
2.11	TXB1	250	6.75	7.42	12500	1.01	13.30
2.21	TXB2	250	2.02	5.64	12500	2.69	5.49
2.29	PGE3	250	4.16	14.35	12500	2.95	3.42
2.45	PGF2 $\alpha$	250	2.92	7.18	12500	0.42	2.20
2.57	PGE2	250	4.91	12.92	12500	2.50	4.47
2.68	PGD2	250	3.98	14.70	12500	2.13	7.51
2.83	LXA4	250	4.56	6.84	12500	3.44	6.33
2.91	LTD4	250	2.04	5.80	12500	2.70	3.51
3.49	LTB4	250	0.69	7.71	12500	2.02	2.06
3.53	14,15-DiHETE	250	0.51	8.57	12500	2.97	2.14
3.75	5,6-DiHETE	250	2.43	11.05	12500	1.26	4.21
4.51	5-HEPE	250	2.19	4.82	12500	3.26	3.71
4.58	13-HODE	2500	10.57	12.76	12500	3.59	5.68
4.6	9-HODE	250	3.05	6.93	12500	3.47	2.62
4.63	20-HDHA	2500	7.16	7.99	12500	5.54	3.72
4.71	15-HETE	2500	2.55	9.42	12500	3.21	7.73
4.81	11-HETE	250	1.81	8.13	12500	3.12	2.06
4.9	8-HETE	250	1.76	6.47	12500	2.54	2.65
4.91	12-HETE	250	1.69	8.09	12500	2.81	1.97
5.02	5-HETE	250	1.81	9.90	12500	2.43	2.26
5.25	14,15-EET	250	1.03	10.32	12500	5.55	3.86
5.37	CTA2	250	0.55	8.98	12500	1.42	1.94
5.47	8,9-EET	250	3.45	8.47	12500	3.45	2.33
5.94	EPA	250	13.01	14.38	12500	0.44	4.32
6.41	AA	1250	6.17	7.71	12500	3.27	4.78

## **II. Autres méthodes mises en œuvre pour le suivi des oxylipines**

Les performances en termes de sensibilité et de vitesse d'acquisition du triple quadripôle (LCMS-8060) [292] en mode MRM ont été mis à profit pour un suivi des oxylipines des échantillons cellulaires. Une méthode de suivi par MRM sur un triple quadripôle **LCMS-8060** a été développée à des fins de comparaison du profil en eicosanoïdes cellulaires avec celui obtenu sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA. Une autre méthode de détection sur le triple quadripôle LCMS-8060 en mode SRM permettant de suivre environ 195 oxylipines a ensuite été utilisée pour compléter les possibles médiateurs lipidiques sécrétés par les macrophages (de notre étude) et non couvert par notre approche ciblée. L'ensemble des résultats d'applications de ces deux méthodes pour l'analyse des échantillons cellulaires sont rapportés dans la **Partie II-Chapitre 5, I-2**).

### **1. Développement d'une méthode de détection des eicosanoïdes sur le LCMS-8060 en mode MRM**

Un transfert de la méthode chromatographique avec Accucore™ C30 suivi d'une optimisation a été effectué sur la chaîne LCMS-8060. Le module d'optimisation automatique de tous les paramètres de source et des énergies de collisions (disponible sur le logiciel LabSolutions™ de Shimadzu) a été mis à profit pour les essais. 2µL de chaque standard à 100 ng/mL ont été injectés dans les conditions chromatographiques avec une phase mobile identique à celle utilisée pour la phase stationnaire Accucore™ C30. A l'issue de l'analyse par MRM, ce module propose de façon automatique les conditions de source optimales propices à l'ensemble des standards analysés ainsi que les transitions et les paramètres qui s'y rattachent. Les paramètres optimaux de source étaient les suivants : mode ESI négatif ; tension d'interface = -5 kV ; CID Gas = 230 kPa ; température d'interface = 300°C ; température de désolvation = 526°C ; température de la ligne de désolvation = 250°C ; CID gaz = 230, débit du gaz de nébulisation = 2,5 L/min ; débit du gaz de chauffage = 10 L/min ; Bloc de chauffage = 450°C ; débit du gaz de chauffage = 10 L/min. L'argon est utilisé comme gaz de collision pour la fragmentation des molécules ciblées sur le premier quadripôle. Après fragmentation par CID, les ions fils sont analysés par le troisième quadripôle (Q3) avant d'être envoyé au détecteur. Les résultats des paramètres optimaux ainsi que les transitions suivies sont répertoriés en **Annexe III-9**.



Pour atteindre le nombre de points suffisants par pic chromatographique et obtenir des pics gaussiens, une réduction du nombre de transitions à une par molécule (sauf pour la CTA2, le ( $\pm$ )8(9)-EET-d11 et les AGPI) ainsi qu'une segmentation en 5 du profil chromatographique ont été réalisées. Ainsi dans chaque segment, plusieurs événements peuvent être analysés de manière simultanée, chaque événement correspondant à une transition ici. Ensuite après définition du nombre de point souhaité pour un ion et connaissant sa largeur, on déduit le temps de cycle (en général 0.043 seconde dans cette étude). Le dwell time optimal est ensuite généré automatiquement par le logiciel. N'ayant pas été utilisée pour la quantification des eicosanoïdes dans les échantillons cellulaires, cette méthode n'a pas fait l'objet de validation dans notre travail de thèse. Les résultats de l'application de cette méthode sont décrits dans la **Partie II- Chapitre 5-I-2**.

## **2. Méthode d'analyse d'oxylipines sur le LCMS-8060 en mode SRM**

Pour l'analyse de molécules qui s'ionisent en mode ESI positive comme négative comme les peptido-leucotriènes ou qui répondent en un seul mode, nombre de méthodes de détection en spectrométrie de masse consistent à une analyse en différentes acquisitions. Pour l'analyse de 36 ethanolamides en mode ESI positif et 141 eicosanoïdes en mode ESI négatif, Dumlaou, *et al.* ont rapporté une méthode en deux acquisitions différentes [107]. La même approche a été utilisée pour l'analyse d'isomères de cystéinyl-leucotriènes [293]. De nos jours, plusieurs spectromètres de masse sont équipés d'un système de commutation rapide de l'ordre de plusieurs dizaines de millisecondes permettant de basculer entre la polarité positive et négative [292]. Le triple quadripôle LCMS-8060 de Shimadzu est équipé d'un système de commutation ultrarapide permettant à une seule acquisition d'analyser l'ensemble des molécules en mode ESI négatif et positif sans perte de sensibilité, ni de vitesse d'acquisition. Avec un temps de changement de polarité de la source de 15 ms, une méthode a permis de suivre environ 137 oxylipines par SRM en mode négatif et positif sans perte en limite de détection : de l'ordre de 0.5 à 200 pg [292]. Cette technologie a permis à ce jour à Shimadzu de mettre au point une autre méthode d'analyse de 214 molécules (195 médiateurs lipidiques et 19 standards deutérés) par SRM sur son instrument LCMS-8060 avec une vitesse de changement de polarité de 5 ms. La chaîne LCMS-8060 nous a permis d'explorer les médiateurs lipidiques non incluses dans notre méthode ciblée mais qui seraient potentiellement relarguées par les macrophages THP-1 et J774

dans des conditions inflammatoires ou à l'état basal. Une phase mobile à base d'eau contenant 0.1% d'acide formique (A) et d'acétonitrile (B) délivré à un débit de 0.4 mL/min avec une phase stationnaire Kinetex C8 (150 mm L. × 2.1 mm I.D., 2.6 µm), avec une température de 40°C ont permis de séparer les 214 molécules en amont du spectromètre de masse. Le gradient utilisé était le suivant : 10 %B. (0 min); 25 %B. (5.0 min) ; 35 %B. (10.0 min) ; 75 %B. (20.0 min) ; 95 %B. (20.1 - 25.0 min). Les paramètres de source sont les suivants : ESI (positif et négatif), débit du gaz de nébulisation = 3 L /min, débit du gaz de séchage = 10 L/min, Débit du gaz de chauffage = 10L/min, temperature de la ligne de désolvatation = 250°C, Bloc de chauffage = 400°C, température de l'interface = 300°C, pression du gaz CID = 230 kPa. Les conditions de fragmentations ainsi que les transitions sont rapportées dans l'étude de Yamada, *et al.* [292]. Cette méthode a permis de mettre en lumière pour la première fois dans la littérature entre 32 et 77 médiateurs lipidiques relargués par des macrophages J774 et THP-1 dans différentes conditions de stimulations. Ces résultats ont été représentés sous forme de carte de chaleur dans la **Partie II-Chapitre 5-I-2.3.**

## Conclusion

Au terme de ce développement, une méthode de détection par LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA segmenté a été réalisée pour le suivi des eicosanoïdes suivant une approche ciblée (26 molécules). Aussi, les performances du triple quadripôle LCMS-8060 ont permis de développer une méthode en mode MRM et d'utiliser une autre méthode en mode SRM (développée par Shimadzu).

Sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro, le mode de fragmentation par CID n'a pas été retenu car il ne permet pas d'obtenir l'ion fragment de quantification le plus intense possible. L'acquisition en mode SRM au niveau de la trappe ionique n'a pas servi nos objectifs du fait d'une fréquence d'acquisition insuffisante. Une fragmentation par HCD et une analyse en mode DDA avec segmentation sont le compromis pour à la fois obtenir une fréquence d'acquisition (~2 Hz) et des LOD satisfaisants. Enfin, la méthode RP-HPLC couplée au LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA segmenté a permis de suivre tous les eicosanoïdes stables. Les limites de détection et de quantification de l'ordre du pg injecté sur colonne sont comparables à ceux retrouvés sur certains TQ, et nous ont permis de suivre et doser des eicosanoïdes cellulaires (**Partie II, Chapitre 5-II**). Cette méthode a ensuite été validée en termes de sélectivité, de linéarité, de LOD, d'exactitude et de précision suivant les normes de validations de méthodes bioanalytiques de l'agence européenne du Médicament [289]. En parallèle de notre méthode en RP-HPLC-

MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) en mode DDA segmenté, une méthode d'analyse des eicosanoïdes par MRM sur une chaîne LCMS-8060 a été développée et a servi pour compléter voire élargir le nombre d'oxylipines sécrétées par les macrophages (J774 et THP-1) suivant notre approche ciblée. Les résultats issus de l'application de méthodes sur la LCMS-8060 sont présentés dans la **Partie II-Chapitre 5-I.2**. La LCMS-8060 de par sa vitesse de changement de polarité très faible, a permis de mieux suivre les molécules qui s'ionisent dans les deux modes (positif et négatif) et dont l'analyse requiert une comparaison de leur intensité suivant les deux modes tels les peptido-leucotriènes. De plus, grâce à sa technologie et à ses caractéristiques intrinsèques, la LCMS-8060 a permis de suivre l'ensemble des molécules de notre mélange avec une fréquence nettement supérieure à celle obtenue sur le LTQ-Orbitrap® Velos.

En effet, il subsiste des difficultés pour obtenir des cadences d'acquisitions satisfaisantes sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro pour analyser un grand nombre de molécules en une seule analyse. En effet, le temps de cycle du LTQ-Orbitrap® Velos Pro est très long comparativement aux autres analyseurs de masse. L'oscillation des ions dans un champ électrique de l'Orbitrap® rallonge le temps de cycle d'où la faible fréquence d'acquisition. En revanche, des fréquences d'acquisitions quatre fois plus importantes d'une Q Exactive rapportée dans le cadre d'analyse de protéine permettrait d'analyser un nombre plus important d'oxylipines [294]. En raison de sa haute résolution et de sa grande précision sur la masse, l'Orbitrap® peut analyser aussi bien des macromolécules multichargées que de petites molécules comme les eicosanoïdes [145,253] et ce avec des performances proches des autres appareils de spectrométrie de masse tel que le triple quadripôle. Même si le mode MRM du LCMS-8060 semble plus spécifique et permet de gagner en sensibilité, il est important de préciser que la contribution isotopique peut aboutir à des ions fragments spécifiques à certaines molécules et qui ne proviennent pas en réalité des molécules d'intérêt. En revanche, le spectre MS<sup>2</sup> issu d'une acquisition en mode DDA permet de s'assurer et de confirmer l'identité de toute molécule avant toute procédure de quantification. Malgré quelques difficultés notamment en termes de fréquence d'acquisition, notre méthode développée sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro constitue une possible alternative d'analyse des eicosanoïdes dans le cadre d'une approche lipidomique ciblée.

## **Chapitre 4: Développement d'une méthode d'extraction des oxylipines**

Au vu de la complexité du mélange de molécules que l'on peut retrouver dans un milieu cellulaire, une préparation d'échantillon efficace s'impose avant toute analyse en chromatographie ou spectrométrie de masse. L'objectif de cette partie est de développer une méthode d'extraction des eicosanoïdes par SPE et de la confronter à la LLE. L'un des facteurs clé du développement en SPE est le choix raisonné de la phase stationnaire.

## I. Matériel et Méthodologie globale

Au total, sept cartouches SPE différentes de par la nature, la masse, la taille des particules, la surface spécifique et le endcapping ou non de la phase stationnaire ont fait l'objet d'une comparaison de performance. Le **tableau 18** présente les caractéristiques de ces cartouches. L'ensemble du développement a été effectué sur le module de SPE « VacMaster™ 10 » de chez Biotage®, qui est un module d'extraction par SPE à pression positive (**Annexe IV-1**). La composition de solvants de lavage et d'élution ont fait l'objet d'optimisation dans le développement. Tout ce développement a abouti à un protocole optimisé pour chaque cartouche. Ces protocoles optimisés ont ensuite été confrontés entre eux pour choisir une cartouche pour l'extraction de nos molécules d'intérêt. La cartouche choisie a été soumise à une évaluation de l'influence du pH sur l'extraction des eicosanoïdes. Le milieu de culture cellulaire a été utilisé pour mimer l'effet de matrice. Ce milieu est composé de : milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 1% Glutamine, 1% HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ) et 1% PS (Penicilline-Streptomycine). Nous l'appellerons milieu de culture incomplet (MCI), le milieu complet étant celui auquel est ajouté 10% de SVF (serum de veau fœtal).

Un rendement apparent (RA) d'extraction a été calculé pour l'optimisation de la phase mobile de lavage et d'élution suivant l'équation suivante

$$\text{RA (\%)} = \frac{A_{\text{après extraction}}}{A_{\text{sans extraction}}} \times 100. \quad \text{Equation 46}$$

Avec

$A_{\text{après extraction}}$  : Aire sous la courbe de l'ion spécifique de quantification après extraction.

$A_{\text{sans extraction}}$  : Aire sous la courbe de l'ion spécifique de quantification de l'échantillon à 100 ng/mL sans extraction préalable.

Un rendement réel (R) qui prend en compte l'effet de matrice (**Equation 47**) a ensuite été calculé pour comparer tous les protocoles optimisés, ainsi que l'influence du pH.

$$\mathbf{R (\%)} = \frac{A_{\text{après extraction}}}{A_{\text{MC extrait et supplémenté}}} \times \mathbf{100} \quad \mathbf{Equation 47}$$

*A<sub>MC extrait et supplémenté</sub>* : Aire sous la courbe de l'ion spécifique de quantification d'un échantillon obtenu comme suit. 1 mL de milieu de culture incomplet (MCI) est soumis à une extraction, et l'extrait sec est repris par 100 µL d'un mélange d'eicosanoïdes à 100 ng/mL dans du méthanol.

L'effet de matrice (ME) a été calculé suivant l'équation ci-dessous :

$$\mathbf{ME (\%)} = \frac{(A_{\text{MC extrait et supplémenté}} - A_{\text{sans extraction}})}{A_{\text{sans extraction}}} \times \mathbf{100} \quad \mathbf{Equation 48}$$

L'ensemble des optimisations a été effectué suivant le protocole ci-après. 2 mL de MeOH ont servi à activer la cartouche et à éliminer les impuretés de synthèse de la phase stationnaire ; suivi de l'équilibration avec 2 mL d'eau. Après chargement de l'échantillon, un solvant de lavage est appliqué suivi du solvant d'élution. Enfin, l'éluat est évaporé sous flux d'azote à température ambiante puis resolubilisé dans du MeOH avant analyse par la méthode RP-HPLC [270] couplée à celle développée en spectrométrie de masse (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) en mode DDA avec segmentation du profil chromatographique.

**Tableau 18: Caractéristiques des cartouches de SPE de l'étude**

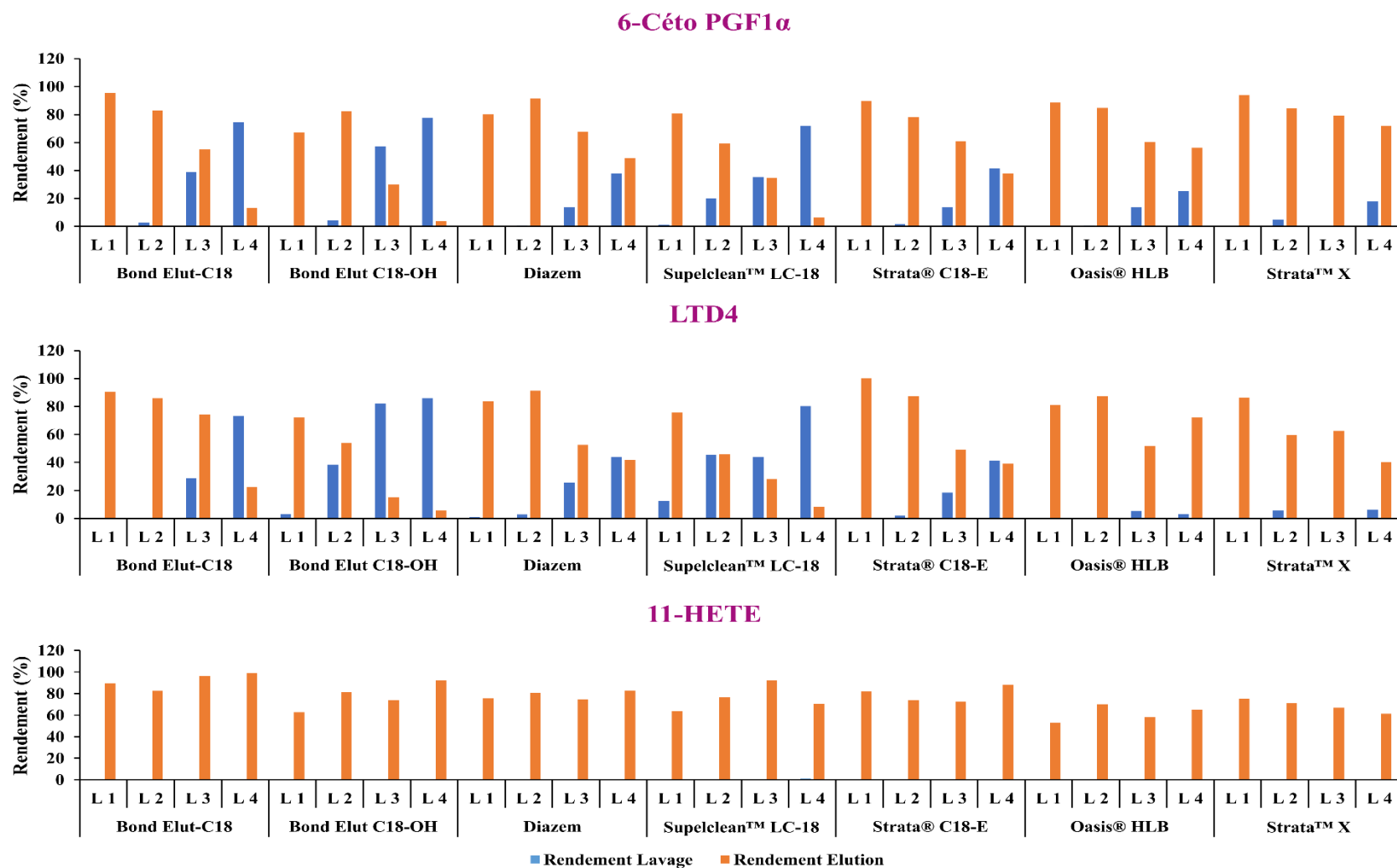
<b>Fournisseur</b>	<b>Nom SPE</b>	<b>Composition de la phase stationnaire</b>	<b>Surface (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Masse de phase</b>	<b>Taille de particules</b>	<b>Diamètre des pores</b>	<b>charge de carbone</b>	<b>Endcapped</b>
<b>Phenomenex</b>	Strata™-X	Styrène-Divinylbenzène	720-780	30 mg	33 µm	76-88 Å	—	—
	Strata™ C18-E	C18 / ODS	500	100 mg	55 µm	70 Å	18,00%	oui
<b>Waters</b>	Oasis® HLB	Hydrophilic N-vinylpyrrolidone and lipophilic divinylbenzene	727-889	60 mg	30 µm	80 Å	—	—
<b>Supelco</b>	Supelclean™ LC-18	C18 / ODS	475	100 mg	45 µm	—	11,5%	oui
<b>Diazem Corporation</b>	Diazem	C18 / ODS	—	200 mg	—	—	—	—
<b>Varian</b>	Bond Elut C18	C18 / ODS	—	100 mg	40 µm	—	—	oui
<b>Varian</b>	Bond Elut C18-OH	C18 / ODS	—	100 mg	40 µm	—	—	non

## II. Optimisation de la phase de lavage

Malgré le développement de nouvelles phases stationnaires à base de polymères connues pour mieux retenir les composés relativement polaires [135] tels que les eicosanoïdes ; un risque de perte de molécules d'intérêt persiste pendant la phase de lavage. La cartouche est activée avec 2 mL de méthanol puis équilibrée avec 2 mL d'eau suivie du chargement de l'échantillon. Quatre phases de lavage à base d'eau et de méthanol (**Annexe IV-2**) ont été testées sur chaque cartouche.

Comme le montre la **figure 65**, l'augmentation de la force éluante de la phase de lavage consécutive à l'augmentation du méthanol au détriment de l'eau dans sa composition, provoque une diminution du rendement en eicosanoïdes. Cette diminution de rendement est due aux pertes pendant la phase de lavage. C'est le cas de certains prostanoïdes et leucotriènes (résultats non montrés). En revanche, les HETE, EET, HODE ne subissent pas de perte pendant l'étape de lavage pour les 4 compositions de solvant de lavage testées. L'ensemble des résultats d'optimisation du solvant de lavage permet de déduire qu'une phase aqueuse (100% Eau) semble adaptée à l'étape de lavage des 7 cartouches.





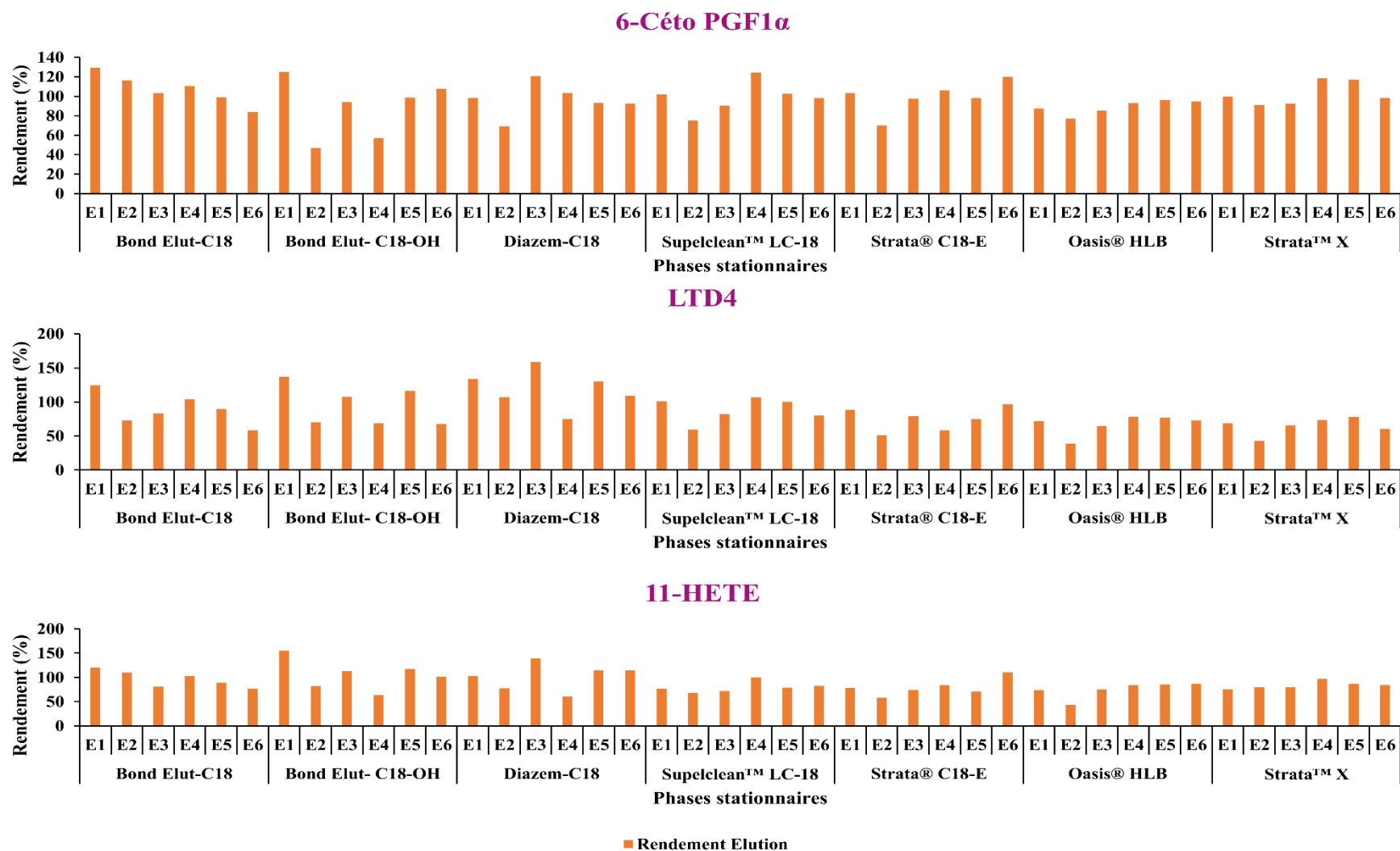
**Figure 65: Optimisation du solvant pour l'étape de lavage de chaque cartouche.Kd**

L pour lavage ; L1 pour Eau (100, v) ; L2 pour Eau/MeOH (90 :10, v/v) ; L3 pour Eau/MeOH (80 :20, v/v) ; L4 pour Eau/MeOH (70 :30, v/v). En bleu, sont rapportés les rendements apparents en eicosanoïdes obtenus dans la phase de lavage. En orange sont rapportés les rendements apparents en eicosanoïdes obtenus dans la phase d'élution.

### III. L'élution

#### 1. Optimisation du solvant d'élution

Six phases mobiles ont été testées (**Annexe IV-2**). Le méthanol et l'acétonitrile sont les solvants les plus utilisés en chromatographie liquide pour l'élution des eicosanoïdes. Au vu de la relative polarité des prostanoïdes, l'ajout d'une certaine proportion d'eau (de l'ordre de 10%) dans la phase d'élution pourrait aider à augmenter le rendement d'extraction pour ces molécules. Du fait des différentes interactions possibles, un mélange ACN-MeOH-Eau comme utilisé dans les travaux de Araujo, *et al.* [118] pourrait aussi être un compromis pour éluer l'ensemble des eicosanoïdes. La **figure 66** montre le rendement d'extraction obtenue en fonction du solvant utilisé. L'analyse de la **figure 66** permet de regrouper les solvants ou mélange de solvants choisis pour chaque cartouche dans le **tableau 19**. De plus, la **figure 66** montre que tous les systèmes de solvants de l'étude permettent d'éluer les eicosanoïdes avec le rendement minimal de l'ordre de 40%. Globalement, le rendement apparent d'extraction du méthanol (101% en rendement de 6-Céto PGF1 $\alpha$  pour la cartouche Supelclean™ LC-18) est supérieur à celui avec de l'acétonitrile (74 % de rendement en 6-Céto PGF1 $\alpha$  pour Supelclean™ LC-18). L'ajout de 10% d'eau dans l'acétonitrile a permis d'augmenter le rendement apparent d'extraction. Cette observation confirme les résultats de Powell [131] où une amélioration du rendement d'extraction pour les prostanoïdes a été obtenue avec une phase organique contenant 10% d'eau. A titre d'exemple pour Oasis® HLB, le rendement apparent d'extraction en LTD4 était de l'ordre de 45% pour une élution à base d'acétonitrile et de 85% pour une élution à base d'eau-acétonitrile (10-90, v/v). La même tendance est observée pour l'ensemble des cartouches testées. Les interactions polaires de type liaison hydrogène de l'eau complètent celles de l'acétonitrile pour augmenter la force éluante du mélange eau-acétonitrile (10-90, v/v). En revanche, l'ajout d'eau dans le méthanol n'a pas d'influence notable sur le rendement apparent d'extraction. Pour des résultats non montrés, cette tendance en variation globale de rendement apparent d'extraction est vérifiée pour la majorité des molécules de l'étude.



**Figure 66: Optimisation du solvant pour l'élution de chaque cartouche SPE.**

E pour phase d'élution ; E1 = 2mL MeOH (100,v) ; E2 = 2mL ACN(100,v) ; E3 = 2mL ACN-MeOH(50:50,v/v) ; E4 = 2mL ACN-H<sub>2</sub>O(90:10,v/v) ; E5 = 2mL MeOH-H<sub>2</sub>O(90:10,v/v) ; E6 = 2mL ACN-MeOH-H<sub>2</sub>O(70:25:5,v/v/v).

**Tableau 19: Récapitulatif cartouches SPE-protocole optimal associé.**

Cartouches	Activation-Conditionnement	Lavage	Elution
Bond Elut-C18	2 mL MeOH + 2mL Eau	100 % Eau	2mL MeOH (100,v)
Bond Elut- C18-OH			2mL MeOH (100,v)
Diazem-C18			2mL ACN- MeOH(50:50,v/v)
Supelclean™ LC-18			2mL ACN-H <sub>2</sub> O(90:10,v/v)
Strata® C18-E			2mL ACN-MeOH- H <sub>2</sub> O(70:25:5,v/v/v)
Oasis® HLB			2mL MeOH-H <sub>2</sub> O (90:10,v/v)
Strata™-X			2mL ACN-H <sub>2</sub> O(90:10,v/v)

## 2. Comparaison des rendements d'extraction des protocoles optimisés

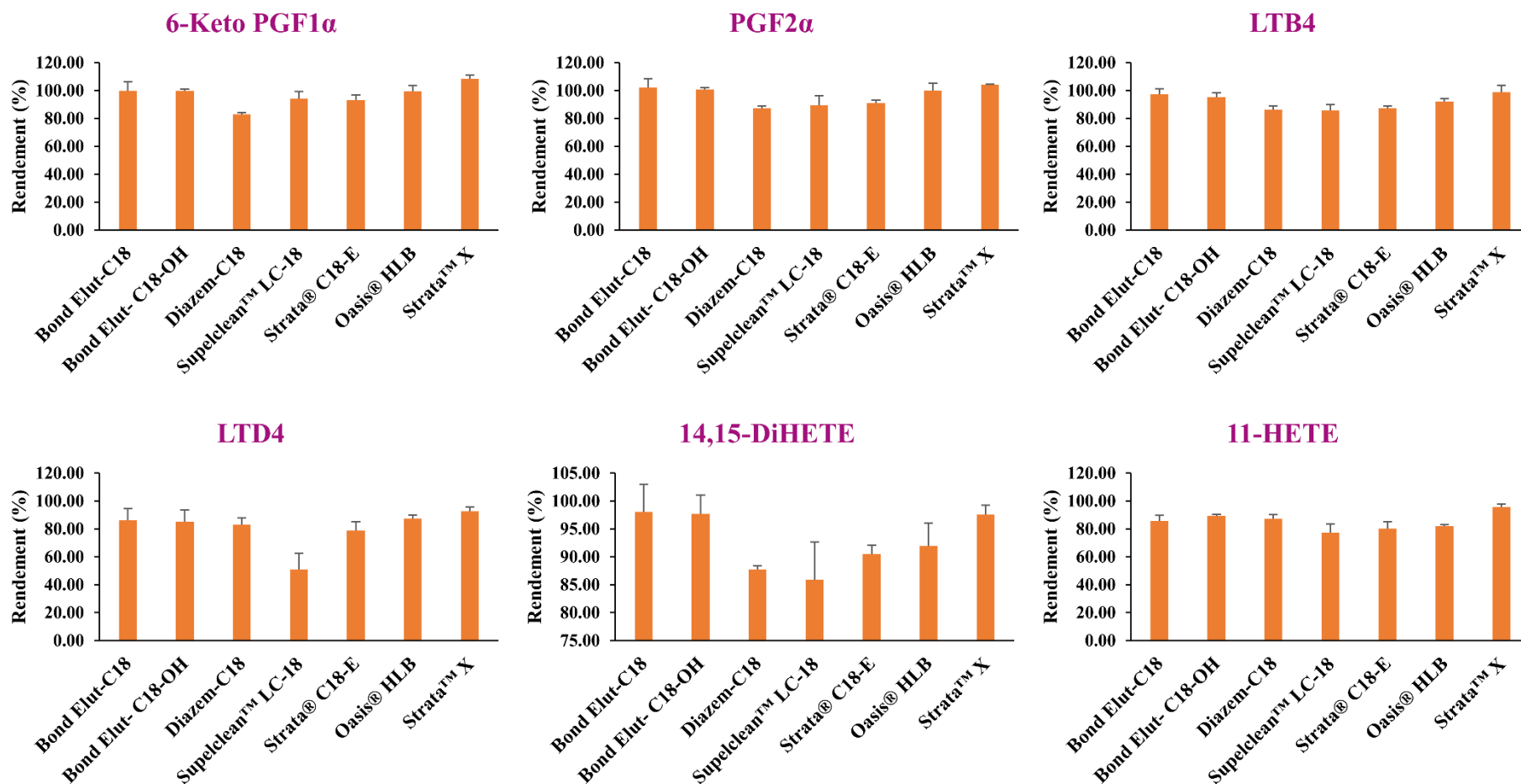
Afin de choisir une cartouche pour l'extraction des eicosanoïdes relargués par les lignées cellulaires de cette étude, une comparaison des performances de chaque cartouche a été réalisée en confrontant les résultats de leur protocole optimisé (**Tableau 19**). Trois cartouches de chaque type ont été testées en appliquant leur protocole optimisé suivant le **tableau 19**. L'éluat de chaque extraction a été évaporé sous flux d'azote, resolubilisé dans du MeOH avant d'être injecté 3 fois pour analyse par LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro). En parallèle, 1 mL de MCI a été extrait par chaque cartouche. L'éluat issu de cette matrice sans eicosanoïdes est ensuite évaporé avant d'être resolubilisé dans 100 µL d'un mélange d'eicosanoïdes à 100 ng/mL. Le rendement d'extraction a ensuite été calculé par rapport à la réponse d'un ion spécifique obtenu dans l'échantillon surchargé comme décrit précédemment dans l'**équation 47**. Une évaluation de l'effet de matrice sur la réponse de chaque analyte a également été réalisée suivant l'**équation 48**.

La **figure 67** montre un récapitulatif des rendements réels d'extraction de différents eicosanoïdes (représentatifs de l'ensemble étudié) en fonction des cartouches utilisées. Un rendement de l'ordre 80% pour la cartouche Supelclean™ LC-18 – la moins performante – démontre l'efficacité de notre démarche analytique pour l'optimisation en SPE. Quatre

cartouches ont des performances proches (**Fig.67**) : Bond Elut ; Bond Elut-OH ; Oasis® HLB ; et Strata™-X. Mis à part quelques différences substantielles en termes de rendement, les 7 cartouches avaient des performances comparables pour l'extraction des prostanoides et la LXA4 (**Annexe IV-3**) : Bond Elut (99 à 109%) ; Bond Elut-OH (82-100%) ; Diazem (82-87%) ; Supelclean™ LC-18 (82-94%) ; Strata® C18-E (83-93%) ; Oasis® HLB (88-99%) ; et Strata™-X (98-108%). Les rendements d'extraction pour les leucotriènes, les HETE et les autres espèces oxydées tels que les EET étaient de l'ordre de 80 à 98% avec quelques légères variations dépendant des qualités intrinsèques à chaque cartouche. L'ensemble des cartouches extraient mieux les prostanoides par rapport aux autres molécules de l'étude. Tous ces résultats décrits ci-dessus sont répétables dans la mesure où les coefficients de variations (CV) associés à ces différents rendements étaient généralement de l'ordre de 1 à 5 % pour l'ensemble des cartouches et dépassent rarement les 9 %. L'effet de matrice est plus présent sur les prostanoides (environ -15%) par rapport aux espèces oxydées à l'instar des HETE et des EET (environ -5%) indépendamment de la cartouche (**Annexe IV-4**). Quelle que soit la cartouche, les rendements réels en AGPI étaient de l'ordre de 50 à 70%. Ce faible rendement s'expliquerait par la structure de ces molécules qui ne possèdent pas de groupements polaires sur le squelette carboné mis à part le groupement carboxyle à l'extrémité du squelette de 20 carbones.

Un rendement moyen d'extraction en eicosanoïdes a été calculé par cartouche. Ce rendement moyen correspond à la moyenne des rendements en oxylipines (AGPI exclus). Il représente 91.57% pour Bond Elut ; 91.03% pour Bond Elut-OH ; 84.65% pour Diazem ; 78.77% pour Supelclean™ LC-18 ; 82.88% pour Strata® C18-E ; 85.43% pour Oasis® HLB ; et 93.09% pour Strata™-X. Les rendements de l'ordre de 95% pour les prostanoides et de 75% pour les HETEs et autres espèces (**Annexe IV-3**) des cartouches SPE sont comparables à ceux obtenus dans une étude d'exploration de biomarqueurs présents dans le liquide cérébro-spinal [295]. La comparaison de ces rendements globaux permet de déduire que Strata™-X, Bond Elut et Bond Elut-OH présentent des performances comparables et semblent toutes adaptées à l'extraction des eicosanoïdes. La cartouche Strata™-X a enfin été choisie pour ses performances satisfaisantes et pour des raisons de coût d'analyse. En effet, la cartouche Strata™-X (966 €/500 cartouches) semble relativement moins onéreuse par rapport à Bond Elut (1588 €/500 cartouches) et Oasis® HLB (3305 €/500cartouches). Un rendement global après cumul des données donne 75% en utilisant la cartouche Oasis® HLB dans des travaux de Rago, *et al.* [39]. Certes, ces travaux ne partagent pas tous les eicosanoïdes de notre étude mais on peut dire que

notre approche permet d'obtenir un meilleur rendement global sur Oasis® HLB (85,43%); et Strata™-X (93,09%).



**Figure 67: Comparaison des performances des 7 cartouches SPE testées avec leur protocole optimisé respectif.**

Les valeurs représentées sont des moyennes  $\pm$  écart-type avec n = 3 cartouches testées pour chaque type. Les rendements représentés sont des valeurs moyennes.

## IV. Etude de l'influence de la matrice et du pH sur l'extraction

### 1. Etude de l'effet de matrice sur le rendement d'extraction

Afin d'évaluer l'effet de matrice sur l'extraction, le même protocole décrit précédemment (**Partie II-Chapitre 4-IV-2**) a été réalisé sur la cartouche Strata™-X suivant son protocole optimisé (**Tableau 19**). Trois cartouches Strata™-X ont permis après extraction des eicosanoïdes d'un milieu MCI supplémenté en eicosanoïdes de calculer le rendement et d'évaluer la répétabilité intra-jour.

Les résultats répertoriés dans le **tableau 20** montrent les meilleurs rendements (supérieurs à 100%) pour l'extraction des prostanoïdes, le LTB4 et 14,15-DiHETE avec une répétabilité de l'ordre de 5%. En revanche, l'extraction semble moins efficace pour les espèces oxydées telles que les HETEs, HODE, HDHA (~80%) et surtout les AGPI précurseurs des eicosanoïdes (40-60%). Cette méthode montre une très bonne répétabilité intra-jour avec un coefficient de variation autour de 5%, donc nettement meilleur qu'un CV de 15% maximum toléré utilisé habituellement dans les procédures de validations de méthodes analytiques [286,289]. La matrice semble réduire le rendement d'extraction. Cet effet est très ressenti sur les prostanoïdes (environ -25%) par rapport aux autres molécules où l'effet est de l'ordre de -15%. Ces résultats rejoignent ceux obtenus à l'étape de comparaison des différents types de cartouches avec leur protocole optimisé (**Annexe IV-4**).

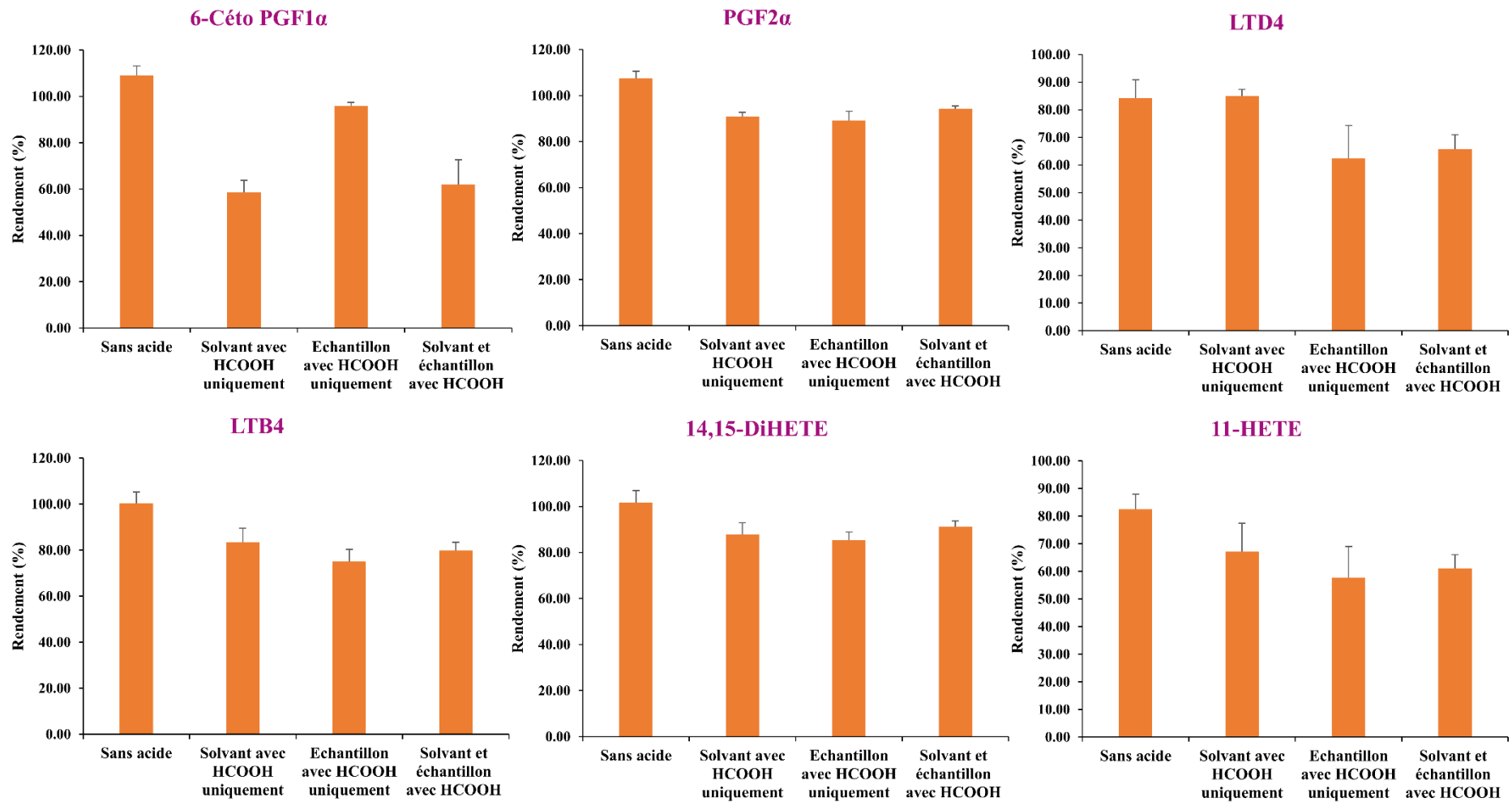


**Tableau 20: Rendements d'extraction d'eicosanoïdes et effet de matrice sur Strata™-X**

Molécules	Concentration (ng/mL)	Strata X		
		Rendement (%)	CV(%)	Effet de matrice (%)
<b>6-Céto-PGF1<math>\alpha</math></b>	100	108.89	4.25	-23.15
<b>TXB2</b>	100	107.36	5.34	-42.40
<b>PGE3</b>	100	109.70	6.99	-17.62
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	100	107.46	3.14	-17.34
<b>PGE2</b>	100	105.36	5.08	-4.95
<b>LXA4</b>	100	91.95	15.90	-3.82
<b>LTD4</b>	100	84.32	6.54	-17.42
<b>LTB4</b>	100	100.41	4.85	-11.96
<b>14,15-DiHETE</b>	100	101.77	5.25	-8.93
<b>5,6-DiHETE</b>	100	96.83	7.66	-14.76
<b>5-HEPE</b>	100	95.06	5.44	-25.94
<b>13-HODE</b>	100	88.22	2.59	-15.45
<b>9-HODE</b>	100	87.65	4.75	-14.26
<b>20-HDHA</b>	100	80.51	4.94	-13.85
<b>15-HETE</b>	100	84.18	4.32	-1.68
<b>11-HETE</b>	100	82.47	5.39	-12.31
<b>8-HETE</b>	100	76.99	5.52	-9.89
<b>12-HETE</b>	100	73.18	3.80	-12.15
<b>5-HETE</b>	100	73.27	5.54	-9.67
<b>14,15-EET</b>	100	81.82	3.42	-13.04
<b>CTA2</b>	100	88.79	1.30	-11.97
<b>8,9-EET</b>	100	73.66	2.05	-10.83
<b>EPA</b>	100	61.96	5.87	-15.30
<b>AA</b>	100	41.32	11.51	-17.86

## 2. Influence du pH sur le rendement d'extraction

L'acidification de l'échantillon à extraire est un prétraitement courant dans la littérature [39,87,146,235]. Une évaluation de l'influence de l'acidification aux différentes étapes de l'extraction par SPE a été réalisée. Pour cela, quatre protocoles ont été testés : un protocole standard sans apport d'acide à aucune des étapes, les solvants d'extraction avec 1% d'acide formique uniquement, l'échantillon acidifié avec l'acide formique à hauteur de 1% et enfin les solvants d'extraction et l'échantillon à extraire sont les tous deux acidifiés à hauteur de 1%. Pour chaque protocole, trois cartouches ont été testées. Des rendements d'extraction ainsi que l'effet de matrice associé ont enfin été calculés (**Fig.68** et **Annexe IV-3 et 4**).



**Figure 68: Influence du pH sur le rendement d'extraction**

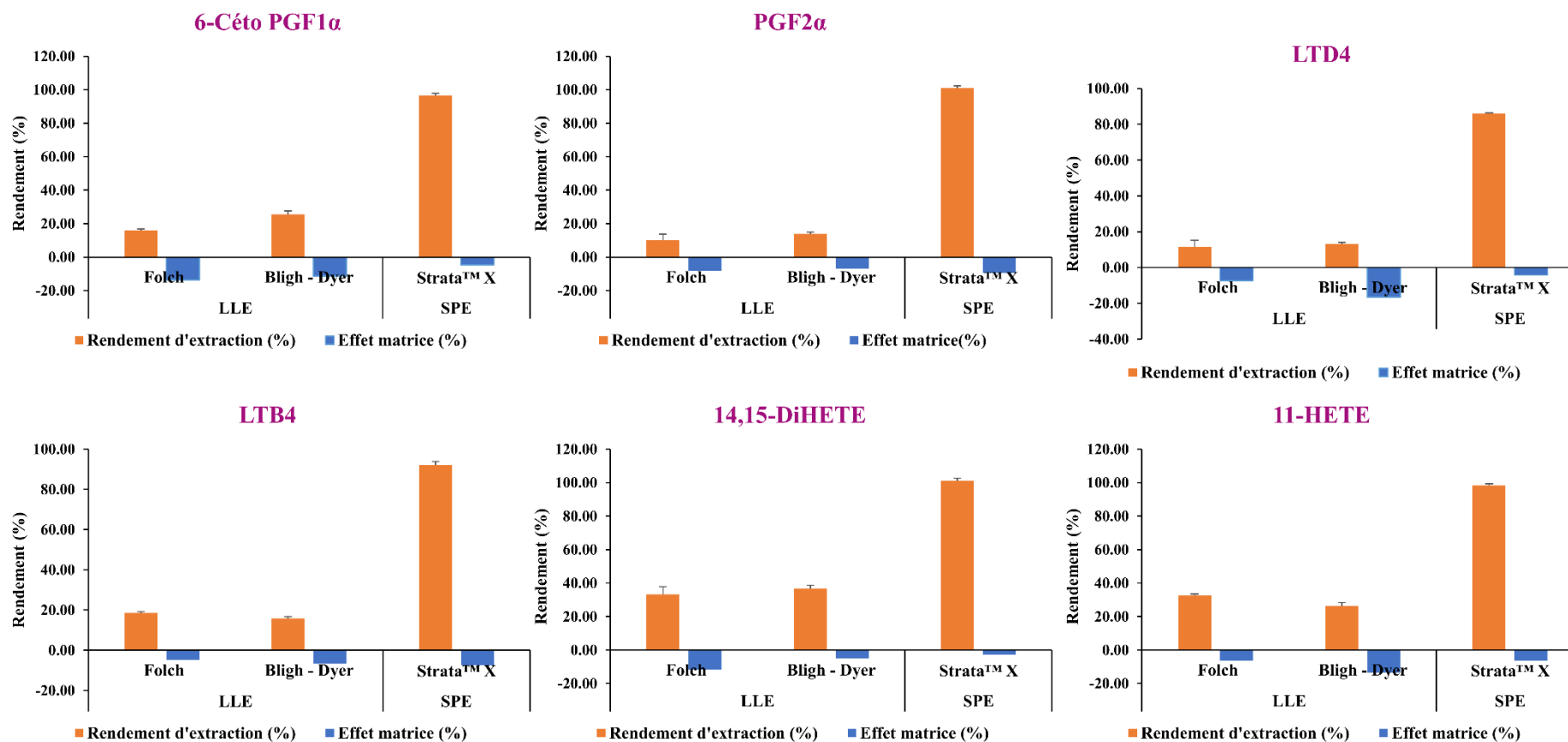
Les valeurs représentées sont des rendements réels d'extraction  $\pm$  le coefficient de variation., n=3

De l'analyse de la **figure 68**, on peut déduire qu'en moyenne l'ajout de l'acide formique semble introduire une variabilité dans la rétention des eicosanoïdes sur Strata™-X. En effet, l'ajout de l'acide formique à hauteur de 1% montre une diminution du rendement d'extraction. La même tendance a été observée pour l'ensemble des molécules étudiées. En revanche, l'ajout d'acide semble réduire l'effet de matrice qui passe de -15% vers environ -5% en moyenne. Cette diminution de l'effet de matrice s'expliquerait par la diminution des interactions polaires de type échanges d'ions entre les eicosanoïdes et les molécules de la matrice. Tous ces résultats permettent également de montrer l'importance des interactions secondaires avec les silanols libres pour l'extraction des composés relativement polaires tels que les eicosanoïdes. L'acide formique réduirait donc significativement les interactions d'échanges d'ions en protonant aussi bien les molécules que les groupements ionisables de la phase stationnaire tels que les silanols.

## **V. L'extraction par SPE et l'extraction liquide liquide pour l'analyse des eicosanoïdes**

Même si la SPE semble être la méthode de prédilection selon la littérature [39,87,108], les eicosanoïdes provenant d'échantillons de lignées cellulaires ont également été extraits par l'extraction liquide liquide. La LLE suivant Folch [126] et celle suivant Bligh & Dyer [296] ont été effectuées suivant les protocoles en **Annexe IV-5**. Des rendements réels d'extractions ainsi que l'effet de matrice ont ensuite été calculés suivant l'**équation 47 et 48**.

Les résultats (**Fig.69** et **Annexe IV-6**) montrent que la SPE est plus efficiente (~93%) que l'extraction liquide liquide (~28%) pour l'extraction des eicosanoïdes. L'effet de matrice semble réduire d'environ 10% le rendement d'extraction des eicosanoïdes quel que soit le type d'extraction (**Annexe IV-6**).



**Figure 69: Comparaison de l'extraction liquide liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE).**  
 Les valeurs représentées sont des rendements réels d'extraction  $\pm$  le coefficient de variation., n=3.

## Conclusion

L'analyse des eicosanoïdes à partir d'échantillons biologiques nécessite l'extraction préalable afin de réduire la complexité de l'échantillon à analyser et d'améliorer la sensibilité de détection des molécules cibles. Dans un objectif de quantification d'eicosanoïdes de deux lignées cellulaires (J774 et THP-1), un développement de méthode d'extraction par SPE a confirmé l'efficacité de la SPE vis-à-vis de l'extraction liquide-liquide pour extraire les eicosanoïdes. La cartouche Strata™-X a été sélectionnée pour notre méthode du fait de ses performances d'extraction (93%) et pour des raisons de coût d'analyse. En réalité, les phases polymériques (Oasis® HLB; et Strata™-X) du fait de leur plus grand caractère hydrophobe et une plus grande surface spécifique [135,297] sont attendus à donner de meilleurs rendements. Cependant, les cartouches Bond Elut (qui sont des phases à base de silice greffée C18) montrent également d'excellents rendements d'extractions pour les eicosanoïdes. Nous reviendrons sur cet aspect dans la **partie III** consacrée à la discussion de notre travail de thèse. L'ajout de l'acide semble réduire significativement les rendements d'extraction. Ce dernier résultat même s'il est surprenant, est informatif en montrant l'importance de certaines interactions secondaires qui contribuent fortement à la rétention en SPE. En effet, si la réduction des silanols résiduels pour les phases de chromatographie liquide peut nuire à la sélectivité de certaines séparations de molécules, la présence de ces fonctions peut conduire en SPE à des interactions additionnelles et favoriser l'extraction de composés polaires. Les interactions hydrophobes restent cependant prépondérantes dans le mécanisme de rétention de la SPE.

## **Chapitre 5: Applications des méthodes développées sur des modèles cellulaires**

Il est important de rappeler l'origine des deux lignées de macrophages puisque le profilage en eicosanoïdes est dépendant du type cellulaire [86]. Les cellules THP-1 sont issues du sang d'un patient atteint d'une leucémie monocyttaire aiguë il y a plus de 30 ans. Cette lignée monocyttaire humaine THP-1 est largement utilisée pour l'étude de la fonction des monocytes et des macrophages, ainsi que dans la recherche sur la leucémie. Les cellules J774 étudiées sont quant à elles des macrophages de Souris. Ces deux lignées de macrophages (J774 et THP-1) ont été utilisées pour mimer des modèles de développement de cellules spumeuses. Des expériences de suppléments en EPA de la membrane des macrophages THP-1 et J774 ont permis de montrer que les variations de l'efflux du cholestérol semble dépendre du type cellulaire [35,298]. Une évaluation de l'efflux de cholestérol sur des modèles cellulaires stimulés par le LPS sera rapporté dans ce chapitre, en plus de l'évaluation quantitative des eicosanoïdes comme potentiellement impliqués dans les fluctuations de cet efflux.

La méthode couplée RP-HPLC-LTQ-Orbitrap® Velos Pro mais aussi celles sur la LCMS-8060 seront utilisées dans ce chapitre pour le profilage et la quantification des eicosanoïdes des surnageants cellulaires de macrophages J774 et THP-1 dans différentes conditions. L'objectif de ce chapitre est de tenter de relier les variations d'eicosanoïdes avec l'efflux du cholestérol des macrophages après incorporation de l'EPA dans leur membrane, un des facteurs antiathérogènes connus.

## **I. Profilage des eicosanoïdes relargués par des lignées cellulaires J774 et THP-1**

### **1. Matériel et Méthodes**

#### **1.1. Culture des lignées cellulaires J774 et THP-1**

La lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 et les macrophages J774 ont été obtenus auprès de l'American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA Molsheim, France). Les monocytes sont décongelés et cultivés en suspension dans du milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1% de glutamine, 1% de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) et 1% d'un cocktail d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine). Ce milieu sera dénommé milieu de culture complet (MCC). Un renouvellement du milieu est réalisé tous les deux à trois jours dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> de surface avec bouchon à membrane filtrante de 0,2 µm. Le

renouvellement du milieu de culture sur les monocytes THP-1 est effectué via une centrifugation à 1200 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot est suspendu dans du milieu frais et les cellules sont comptées avant leur repiquage. Cette étape est nommée « passage ». Les cellules au-delà du 20<sup>ième</sup> passage ne sont pas utilisées dans cette étude. Les cellules J774 étant des cellules adhérentes, le renouvellement a lieu tous les 2 à 3 jours en aspirant directement le milieu dépourvu de nutriments.

## **1.2. Stimulation par le LPS**

Une différenciation des monocytes THP-1 (flottantes) en macrophages (cellules adhérentes) est réalisée en ajoutant 100 nM de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) au milieu de culture contenant les monocytes THP-1 au jour J0.

Les cellules sont ensuiteensemencées dans des plaques de 6 puits (4 millions de cellules par puits pour les THP-1, 200000 cellules pour les J774) selon les conditions exposées sur le plan de plaque (**Annexe V-1**). Après une confluence minimale à 80% des cellules, une étape d'équilibrage de 1h est réalisée en mettant les cellules au contact avec du milieu de culture incomplet (MCI : Milieu de culture sans SVF). Ensuite, les cellules sont stimulées ou non par du LPS (100 ng/mL) dans du MCC pendant 8h et 24h. En parallèle, 18 réplicats divisés en deux (8h et 24h) sont additionnées de PGE2 dans du MCC pour servir de contrôle positif. Les différents surnageants sont récupérés dans des tubes à hémolyse contenant du MCI avec 0,005% de BHT (m/v) (placé dans de la glace). Les surnageants sont ensuite vortexés puis conservés à -32°C.

## **1.3. Prétraitement et extraction par SPE des surnageants**

Après décongélation des surnageants et vortexage, les surnageants sont centrifugés pendant 10 minutes à 4500 rpm. Cette étape permet ainsi de se débarrasser des débris cellulaires et cellules mortes éventuelles récupérés avec le surnageant. Toute la préparation a lieu sur de la glace et à l'abri de la lumière. Les surnageants sont ensuite soumis à une extraction par SPE suivant le protocole optimisé sur la cartouche Strata<sup>TM</sup>-X. Après équilibration et activation avec 2mL de MeOH + 2mL d'eau, 2mL de surnageant sont chargés sur la cartouche. 1mL d'eau a servi à l'étape de lavage suivie d'une élution par 2mL d'un mélange Eau-ACN (10 : 90, v/v). L'éluat est ensuite évaporé sous flux d'azote à température ambiante puis resolubilisé dans 100 µL de MeOH. Cette étape est suivie d'une préconcentration des 9 réplicats de chaque condition pour en faire un seul échantillon. 5µL de chaque échantillon sont ensuite analysés par LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) dans les conditions chromatographiques de la phase stationnaire



Accucore™ C30 (Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(ACN,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C; débit = 0.5mL/min). Le traitement des données a lieu sous X-Calibur™ et a permis d'extraire les ions spécifiques issus de la fragmentation des molécules suivant l'approche ciblée. Les mêmes échantillons ont été analysés par la méthode développée sur la LCMS-8060 en mode MRM avec la phase stationnaire Accucore™ C30. Afin d'établir une liste la plus exhaustive possible d'oxylipines produites par les macrophages J774 et THP-1, une autre méthode permettant de suivre environ 195 molécules et 19 standards deutérés par SRM sur la LCMS-8060 (développée par Shimadzu) a été utilisée.

## **2. Analyse des eicosanoïdes cellulaires par les deux méthodes développées avec Accucore™ C30 sur les deux spectromètres de masse (LTQ-Orbitrap® Velos Pro et LCMS-8060)**

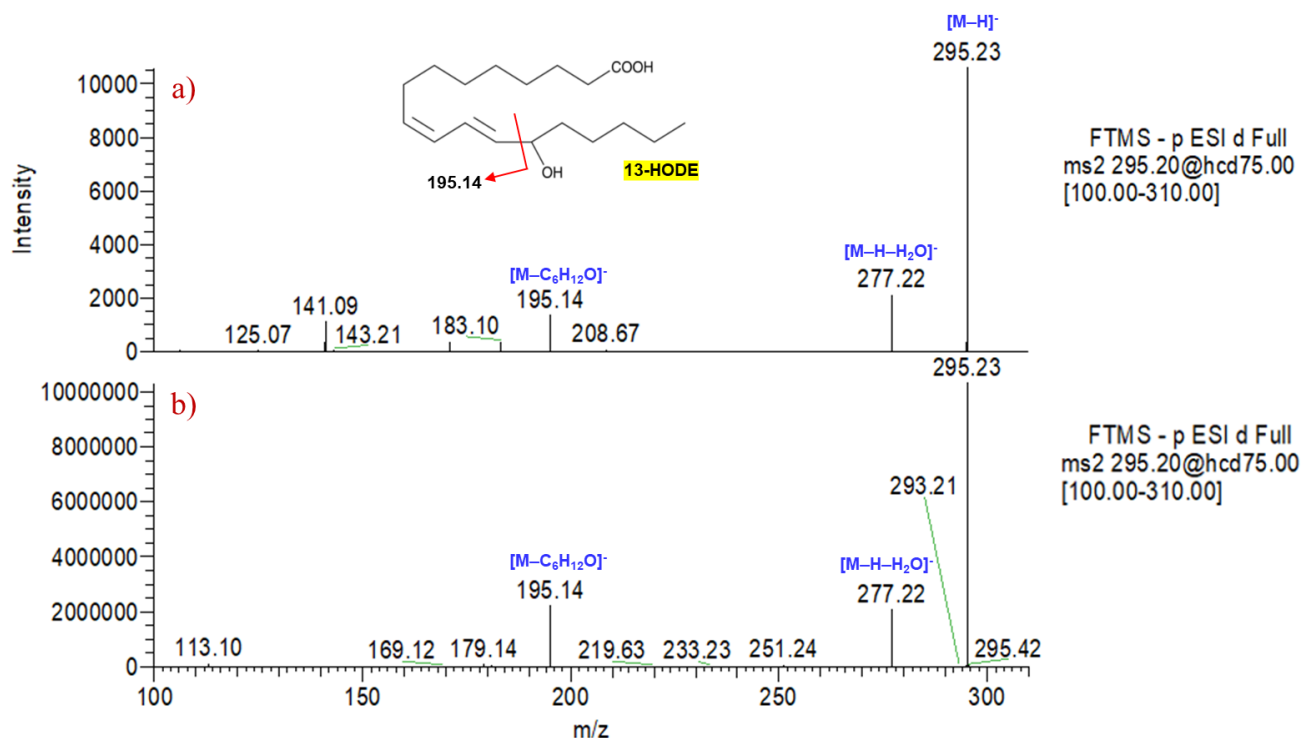
Les macrophages sont essentiels aux processus physiologiques y compris la régulation des processus de l'immunité innée et adaptative, et acteurs dans le développement de maladies inflammatoires. C'est la raison pour laquelle ils servent de modèle *in vitro* pour étudier de nombreuses pathologies. Les macrophages sont des producteurs d'eicosanoïdes et d'autres médiateurs lipidiques apparentés au cours de l'inflammation, mais la résultante issue de l'action d'une population hétérogène d'eicosanoïdes aux actions opposées est très peu décrite voire très peu étudiée dans la biologie des macrophages. Au travers de notre étude, il sera réalisé un profilage comparatif de deux modèles de macrophages J774 et THP-1. Ce profilage a pour but de fournir une analyse qualitative des eicosanoïdes et du métabolisme des deux types de macrophages.

### **2.1. Caractérisation des médiateurs lipidiques par approche ciblée**

Dans ce travail de thèse, l'analyse des eicosanoïdes relargués par des lignées cellulaires THP-1 et J774 dans différentes conditions de stimulation pour mimer le processus inflammatoire ayant lieu au cours de l'athérosclérose a pu être réalisée grâce aux différentes méthodes séparatives développées.

Parmi les molécules relarguées par THP-1 et J774, trois sont des prostanoïdes (TXB2, PGF2 $\alpha$  et la PGE2), une lipoxine (LXA4), deux HODE (9-HODE et 13-HODE) et cinq HETE (14,15-DiHETE, 15-HETE, 11-HETE, 12-HETE, 5-HETE) et un précurseur des eicosanoïdes qu'est l'AA. Deux molécules initialement non incluses dans notre méthode ciblée ont été mises en

lumière : 13-HODE ainsi qu'une molécule dont la caractérisation n'est pas décrite dans la littérature (**Annexe V-2**). Nous rapportons ici l'un des premiers intérêts de la segmentation du profil chromatographique pour une analyse par DDA. En effet, deux segments ont été définis pour, d'une part, les molécules de  $m/z$   $[M-H]^-$  295 et, d'autre part celles de  $m/z$   $[M-H]^-$  319. Par conséquent, il est possible d'identifier des oxylipines ayant ces masses et qui éluent dans ces fenêtres. La molécule de  $m/z$  de 295 a été identifiée comme étant du 13-HODE (**Figure 70-a**). L'ion 195.14 ( $m/z$ ) correspond à une perte d'aldéhyde ( $C_6H_{12}O$ ) issu du clivage entre C12-C13 comme montré sur la **figure 70**. L'identification des oxylipines sécrétées par les macrophages a été réalisée à partir de notre méthode ciblée avec une exactitude en masse inférieure à 5 ppm (**Annexe V-3**). A ce jour et à notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature d'études lipidomiques permettant de répertorier des oxylipines produites par les macrophages THP-1 et J774 dans différentes conditions de stimulations. Notre approche ciblée sur la base des 26 molécules, a permis d'identifier 13 molécules relarguées par les macrophages THP-1 et J774 dans différentes conditions de stimulation.

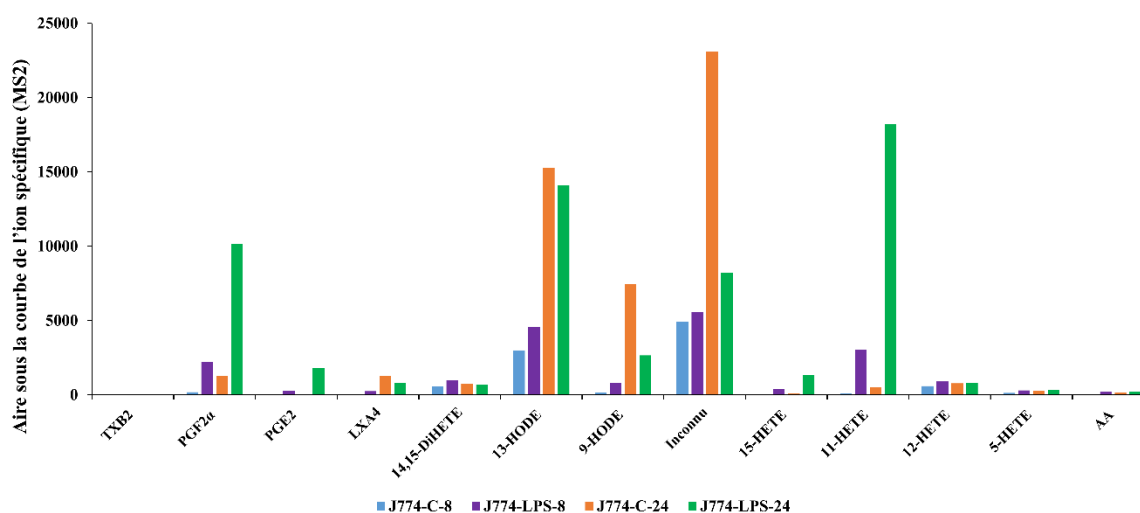


**Figure 70 : Identification du 13-HODE relargué par les macrophages.**

a) Spectre MS/MS du 13-HODE retrouvé dans le surnageant du macrophage J774 après 24h de stimulation par le LPS (100ng/mL). b) Spectre MS/MS du 13-HODE. Les spectres ont été acquis à une résolution de 7500.

## 2.2. Analyse qualitative du profil des oxylipines des macrophages J774 et THP-1 (LTQ-Orbitrap® Velos Pro)

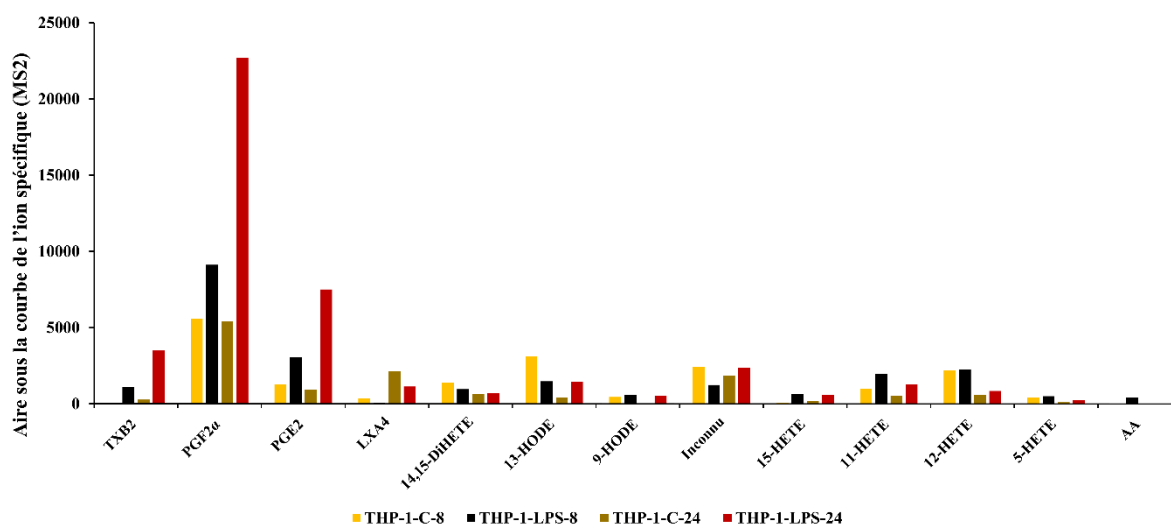
La **figure 71** montre un profilage de 13 molécules et une molécule inconnue. La plupart des molécules sont produites par les macrophages J774 indépendamment de la stimulation par le LPS comparativement à la PGE2 et au 15-HETE qui ne semblent produits qu'à l'état stimulé par le LPS. La stimulation par le LPS permet d'augmenter globalement la production des prostanoides (TXB2, PGF2 $\alpha$  et PGE2). La TXB2 n'est produite qu'en condition inflammatoire et disparaît au bout de 24h. En comparant les niveaux de synthèse de certaines espèces moléculaires, le temps d'incubation semble avoir une influence significative sur la production des espèces oxydées telles que le 13-HODE, le 9-HODE et le 11-HETE qui augmentent. Contrairement à ce à quoi on pouvait s'attendre en condition inflammatoire, on note une diminution de production de certaines espèces (9-HODE, molécule inconnue) par comparaison de l'état basal avec l'état stimulé. Ces diminutions observées seraient dues à des processus d'oxydation et/ ou d'hydrolyse qui aboutissent à la genèse d'autres espèces d'eicosanoïdes [67,299,300].



**Figure 71: Profilage global des oxylipines et un précurseur d'eicosanoïde sécrétés par les macrophages J774 stimulés ou non par le LPS pendant 8h et 24h et analysés par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro)**

J774-C-8 et J774-C-24 correspondent aux échantillons de macrophages à l'état basal (sans stimulation) incubés respectivement pendant 8h et 24h. J774-LPS-8 et J774-LPS-24 sont les échantillons obtenus après stimulation par du LPS (100ng/mL) respectivement pendant 8h et 24h. Les échantillons sont ensuite analysés après extraction par RP-HPLC-MS/MS (Orbitrap® Velos Pro). Phase stationnaire : Accucore™ C30 ; Phase mobile : A (Eau :ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 5 $\mu$ L ; Débit = 0,5mL/min

L'analyse de la **figure 72** montre le profilage en eicosanoïdes des THP-1 dans différentes conditions de stimulations. Un temps plus long de stimulation par le LPS aboutit à une production plus importante de prostanoïdes par les macrophages THP-1. A titre d'exemple, la TXB2 voit son niveau multiplié par un facteur 10 entre 8 et 24h de stimulation. En revanche, la stimulation par le LPS quel que soit le temps de stimulation ne semble pas influencer significativement la production des autres espèces.



**Figure 72: Profilage des oxylipines et un précurseur d'eicosanoïde sécrétés par les macrophages THP-1 stimulés ou non par le LPS pendant 8h et 24h et analysés par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro).**

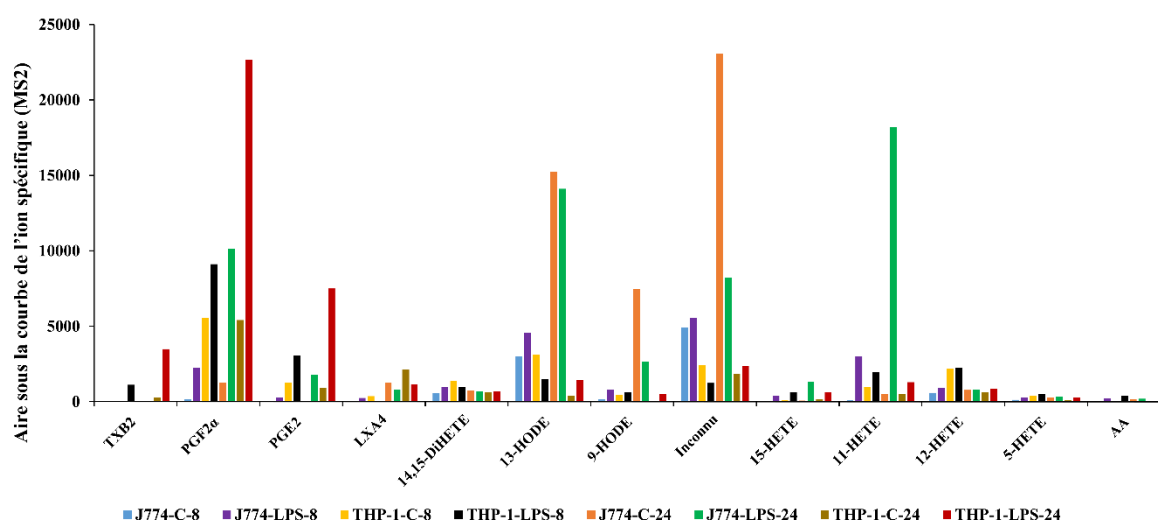
THP-1-C-8 et THP-1-C-24 correspondent aux échantillons de macrophages THP-1 à l'état basal (sans stimulation) incubés respectivement pendant 8h et 24h. THP-1-LPS-8 et THP-1-LPS-24 sont les échantillons obtenus après stimulation par du LPS (100ng/mL) respectivement pendant 8h et 24h. Les échantillons sont ensuite analysés après extraction par RP-HPLC-MS/MS (Orbitrap® Velos Pro). Phase stationnaire : Accucore™ C30 ; Phase mobile : A (Eau: ACN, 70:30, v/v) contenant 0,04% HCOOH; B (Acétonitrile, 100, v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 5µL ; Débit = 0,5mL/min

### 2.3. Analyse comparative du profil global en eicosanoïdes des macrophages

#### J774 et THP-1

Les données issues de l'analyse de surnageants des deux lignées cellulaires (THP-1 et J774) ont ensuite été compilées (**Fig.73**) afin de mieux comparer les variations en termes d'eicosanoïdes produits et de définir une tendance de production des espèces moléculaires majoritaires en fonction des deux lignées cellulaires suivant notre approche ciblée. En effet, la production en eicosanoïdes dépend des phénotypes de macrophages [86]. Les temps d'incubation et de stimulation affectent positivement la production de prostanoïdes (**Fig.73**). La TXB2 semble être produite uniquement par les macrophages THP-1 en condition inflammatoire. A l'état basal comme à l'état stimulé par le LPS et indépendamment du temps d'incubation (8h et 24h), les

macrophages THP-1 produisent plus de PGF2 $\alpha$  et de PGE2 par rapport aux macrophages J774. Par conséquent, les macrophages THP-1 produisent plus de prostanoïdes comparativement aux macrophages J774 (**Fig.73** et **Annexe V-4**). La variation du niveau de certaines molécules comme le 14,15-DiHETE et le 5-HETE sont globalement comparables entre J774 et THP-1. Aussi, les macrophages J774 semblent avoir un métabolisme qui permet de produire plus d'espèces oxydées (13-HODE ; 9-HODE ; molécule inconnue de m/z 319, 11-HETE) par rapport aux macrophages THP-1 (**Fig.73** et **Annexe V-5**). Quel que soit le type cellulaire, le LXA4, le 13-HODE et le 9-HODE relargués à l'état basal sont plus importants qu'à l'état stimulé. Le LPS ne semble donc pas stimuler la production de ces dernières molécules. Cette observation s'expliquerait par le fait que le LPS stimule préférentiellement la voie de la COX [38,85,89]. Cette voie est bien décrite dans la littérature [38,66,67] pour aboutir à la production des prostanoïdes même si les mécanismes complexes impliqués dans la cascade de signalisation peuvent activer la voie de la LOX [85] aboutissant à la production d'autres médiateurs lipidiques oxydés tels les HETE et HODE.

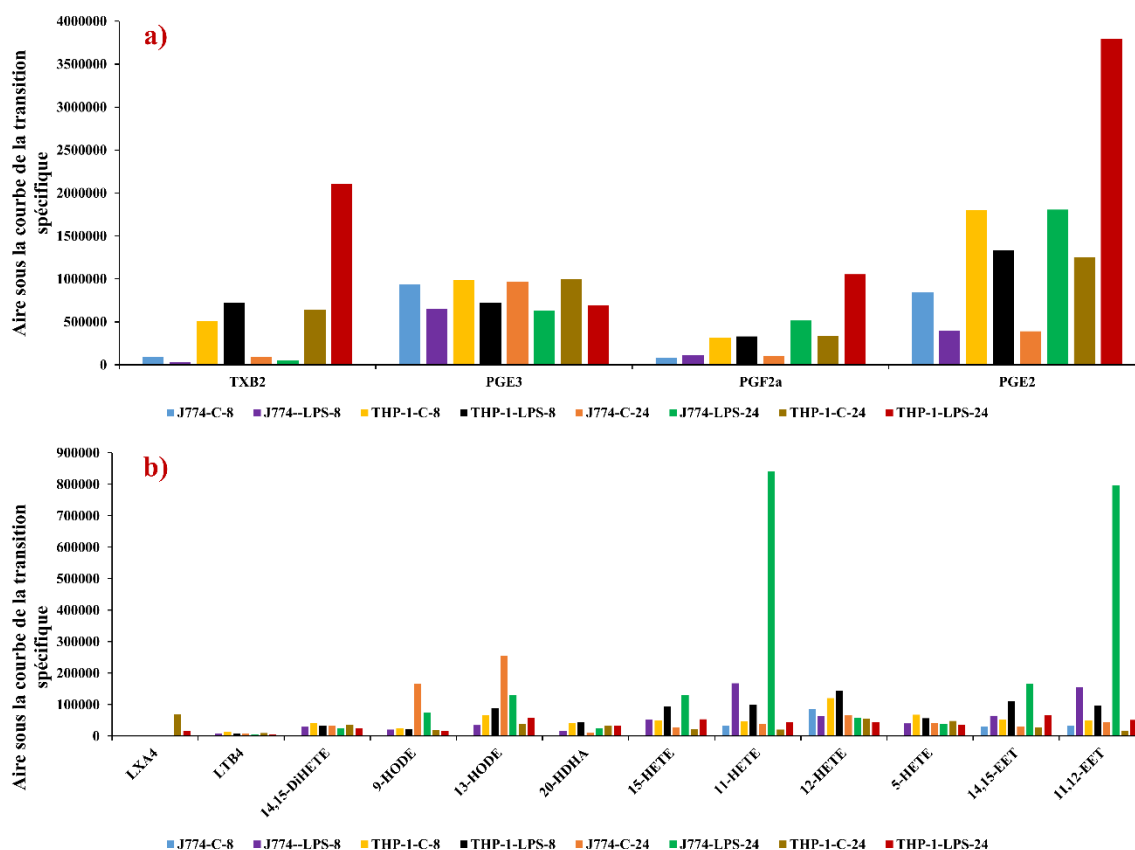


**Figure 73: Profilage global des oxylipines et un précurseur d'eicosanoïde sécrétés par les macrophages THP-1 et J774 stimulés ou non par le LPS pendant 8h et 24h et analysés par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro).**

Pour toutes les conditions, C correspond à l'état basal, LPS correspond à l'état stimulé, le dernier chiffre (8-24) correspondent aux temps d'incubation et/ ou de stimulation. Les échantillons sont ensuite analysés après extraction par RP-HPLC-MS/MS (Orbitrap® Velos Pro). Phase stationnaire : Accucore™ C30 ; Phase mobile : A (Eau: ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 5 $\mu$ L ; Débit = 0,5mL/min

Les mêmes extraits issus de surnageants de J774 et THP-1 dans différentes conditions (état basal *versus* état stimulé pendant 8 et 24 h) ont été analysés par la méthode développée sur la LCMS-8060. L'objectif est d'élargir le spectre de médiateurs lipidiques relargués par ces

macrophages. A la différence de l'acquisition avec la méthode en mode DDA sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro qui a permis d'identifier de façon systématique 11 oxylipines (**Fig.73**), la méthode développée avec la phase stationnaire Accucore C30 couplée au triple quadripôle de la chaîne LCMS-8060 permet de mettre en lumière au total 16 Oxylipines (**Fig.74**). Cinq nouvelles molécules ont donc été détectées à savoir, la PGE3, le LTB4, le 20-HDHA, le 14,15-EET et le 11,12-EET. Sur la base de ces résultats et compte tenu du fait que de faibles niveaux de TXB2 ont été détectés chez les macrophages J774, la LCMS-8060 semble avoir une LOD inférieure à celle du LTQ-Orbitrap® Velos Pro. L'augmentation de la production de prostanoïdes dépendant du temps d'incubation et de stimulation observée avec la méthode en mode DDA se trouve confirmée par celle en mode MRM sur la LCMS-8060. En revanche, des niveaux comparables ont été enregistrés pour la PGE3 quelle que soit la condition basale ou stimulée. Ceci serait liée à la très faible abondance de la membrane de ces cellules en EPA qui est le précurseur direct de la PGE3. On note une diminution de PGE2 produite quel que soit le type cellulaire après 8 h de stimulation par le LPS par rapport à l'état basal. Une diminution de la production des HODE semble également se produire chez les macrophages J774 après 24 h de stimulation par le LPS (**Fig.74**). La variation globale observée en comparant les profils des deux macrophages permet de déduire que les THP-1 produisent plus de prostanoïdes par rapport aux macrophages J774 (**Fig.74-a**). Quelles que soient les conditions d'exposition des deux lignées cellulaires, des niveaux comparables de certaines molécules (LTB4 ; 14,15-DiHETE ; 20-HDHA ; 5-HETE) peuvent être soulignés (**Fig.74-b**). L'analyse du profil ci-contre (**Fig.74-b**) montre globalement que les macrophages J774 produisent plus d'espèces oxydées (9-HODE, 13-HODE, 20-HDHA, 11-HETE ; 11,12-EET) comparativement aux macrophages THP-1. Ces résultats confirment donc ceux déduits précédemment par une analyse en mode DDA sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro.



**Figure 74: Profilage global des eicosanoïdes relargués par les macrophages THP-1 et J774 stimulés ou non par le LPS pendant 8h et 24h et analysés par RP-HPLC-QqQ (MRM) (LCMS-8060).**

a) profilage des prostanoïdes, b) profilage des autres espèces oxydées telles que les LTs, HETEs, HODEs et EETs. Pour toutes les conditions, C correspond à l'état basal, LPS correspond à l'état stimulé, le dernier chiffre (8-24) correspondent aux temps d'incubation et/ ou de stimulation. Les échantillons sont ensuite analysés après extraction par RP-HPLC-QqQ (LCMS-8060) en mode MRM. Phase stationnaire : Accucore™ C30 ; Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 5µL ; Débit = 0,5mL/min

La méthode d'analyse des médiateurs lipidiques (développée par Shimadzu) sur la LCMS-8060 a ensuite été utilisée pour analyser les mêmes extraits que précédemment.

Au vu du nombre élevé de molécules potentiellement relarguées par ces cellules, les données ont été représentées sous forme de carte de chaleur pour faciliter la lecture et l'interprétation du profil de sécrétion en oxylipines. Sur les 195 oxylipines de la méthode développée par Shimadzu, les macrophages J774 et THP-1 en produisent entre 32 et 42 à l'état basal pendant 8h et 24h (**Tableau 21**). La faible variabilité en termes de nombre de molécules produites à l'état basal à 8h et 24h montre que le métabolisme qualitatif de base des macrophages semble comparable et non influencé par le temps d'incubation (8h et 24h). La stimulation par le LPS permet de multiplier par un facteur deux le nombre de molécules produites à partir des

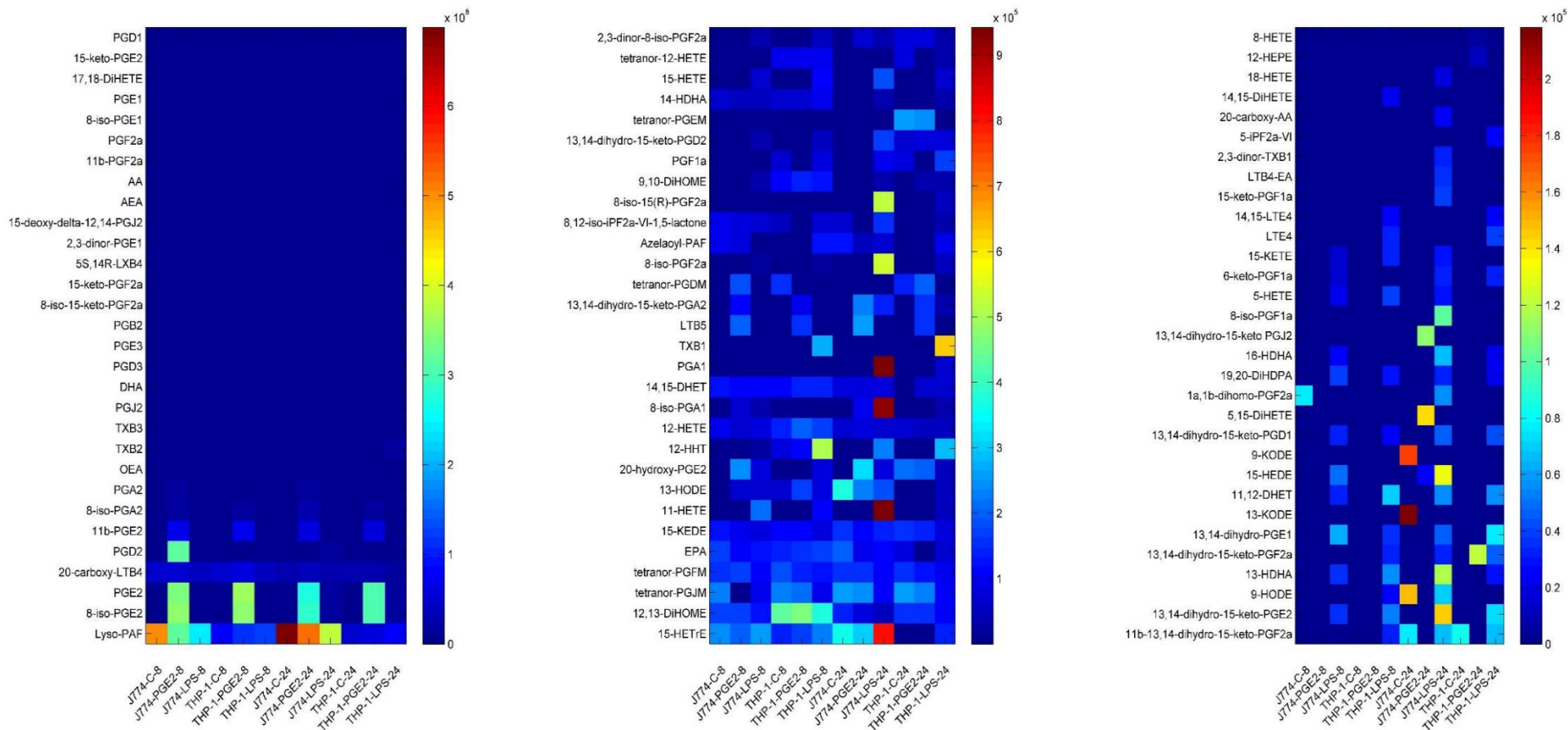
différentes voies de biogénèse (**Tableau 21**). A titre d'exemple, les macrophages J774 à l'état basal pendant 24h relarguent dans le milieu extracellulaire 36 oxylipines contre 77 à l'état inflammatoire. Une abondance qualitative et en termes d'intensité des médiateurs produits par les macrophages J774 en état inflammatoire pendant 24h comparé à l'état basal est illustrée sur la carte de chaleur (**Fig.75**). En effet, les macrophages J774 à l'état basal produisent plus de Lyso PAF ; 15-HETrE ; 13-HODE ; 9-HODE ; 11b-13,14-Dihydro-15-Céto PGF2 $\alpha$  ; 13-KODE et 9-KODE. Si en condition inflammatoire pendant 24h, certaines molécules comme le 8-iso PGF1 $\alpha$  ; le 15-HEDE ; la PGA1 ; la 8-iso PGA1 ; le 11-HETE et le Lyso PAF se démarquent par des niveaux élevés ; d'autres (9-HODE, 13-HODE, 9-KODE, 13-KODE) en revanche voient leur production baisser voire disparaître laissant probablement place à une autre molécule issue d'oxydation ou d'une autre voie métabolique. Nos observations précédentes (**Fig.75**) en ce qui concerne une diminution des niveaux de 9-HODE et 13-HODE à l'état inflammatoire se trouve confirmées par cette carte de chaleur. Le Lyso-PAF est une molécule retrouvée dans la plupart de fluides biologiques en condition inflammatoire [301]. Les macrophages J774 semblent produire une diversité plus importante d'oxylipines en condition inflammatoire comme l'indique le **tableau 21**. En revanche, les macrophages THP-1 produisent peu de Lyso-PAF par rapport aux macrophages J774, et ce, même en condition inflammatoire. Après stimulation pendant 24h par le LPS, les macrophages THP-1, produisent plus de TXB1 ; 12-HHT (12-Hydroxyheptadecatrienoic acid) ; LTE4, 13,14-dihydro-15-céto PGF1 $\alpha$  que les macrophages J774 indépendamment de son état de stimulation (**Fig.75**). La quantité de PGE2 semble diminuer dans les échantillons surchargés avec la PGE2 pendant 24h comparativement au niveau affiché à 8h. En effet la variation de la quantité de prostanoïdes est également sous le contrôle de certaines molécules comme la PGE2 qui agissent par rétrocontrôle négatif sur l'expression de la COX [94,96]. Ces données de la littérature expliqueraient donc la diminution de production de certains prostanoïdes au fur et à mesure que le temps de stimulation ou d'incubation augmente.



**Tableau 21: Inventaire du nombre de médiateurs lipidiques produits en fonction du type cellulaire et des conditions de stimulations**

Pour toutes les conditions, C correspond à l'état basal, LPS correspond à l'état stimulé, le dernier chiffre (8-24) correspondent aux temps d'incubation et/ ou de stimulation.

Modèle étudié	Nombre d'oxylipines relarguées
J774-C-8	32
J774-PGE2-8	43
J774-LPS-8	59
THP-1-C-8	42
THP-1-PGE2-8	45
THP-1-LPS-8	68
J774-C-24	36
J774-PGE2-24	46
J774-LPS-24	77
THP-1-C-24	39
THP-1-PGE2-24	47
THP-1-LPS-24	71



**Figure 75: Représentation graphique sous forme de carte de chaleur des surfaces des transitions de médiateurs lipidiques détectés dans les surnageants des macrophages J774 et THP-1 par LCMS-8060 en mode SRM (méthode Shimadzu)**

Pour toutes les conditions, C correspond à l'état basal, LPS correspond à l'état stimulé, le dernier chiffre (8-24) correspondent aux temps d'incubation et/ ou de stimulation. Les échantillons sont ensuite analysés après extraction par RP-HPLC-QqQ (LCMS-8060) en mode SRM. Phase stationnaire : Kinetex ; Phase mobile : A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 5µL ; Débit = 0,5mL/min

## **II. Analyse quantitative des eicosanoïdes produits par les macrophages J774 et THP-1**

Afin de vérifier notre hypothèse de départ en ce qui concerne l'impact des eicosanoïdes sur la protéine d'efflux ABCA1, il convient d'évaluer la capacité de notre méthode couplée (RP-HPLC-LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA segmenté) à quantifier les oxylipines relarguées dans les deux modèles cellulaires J774 et THP-1. L'objectif de cette partie sera dans un premier temps de mesurer la quantité d'eicosanoïdes relargués par les macrophages THP-1 et J774, et dans un second temps de tenter d'expliquer les fluctuations d'efflux de cholestérol avec la variation quantitative de certaines oxylipines suite à l'incorporation d'EPA dans la membrane des macrophages.

### **1. Matériel et Méthodes**

#### **1.1. Matériel**

Le même matériel ainsi que les mêmes lignées cellulaires (J774 et THP-1) pour le profilage ont été utilisées pour l'analyse quantitative. Le 22-hydroxy-cholesterol et l'acide 9-cis-retinoïque, deux agonistes respectifs de LXR/RXR, et l'EPA ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (France).

#### **1.2. Méthodes**

##### **1.2.1. Mesure de l'efflux du cholestérol**

Les cellules J774 (0.04 millions de cellules par puits) et THP-1 (0.8 million de cellules par puits) sontensemencées dans des plaques de 24 puits dans du MCC. 100  $\mu$ M de PMA ont permis de différencier les monocytes THP-1 en macrophages. Après confluence au bout de 72h, elles sont supplémentées ou non avec de l'EPA (70 $\mu$ M) dissous dans du MCC contenant du BSA (64 mg pour les 100 mL de milieu de culture). Un marquage est réalisé à cette étape en rajoutant du cholestérol tritié (2 $\mu$ Ci/puit) aux milieux de culture supplémentés ou non en EPA. Il s'en suit une étape d'équilibration et de stimulation pendant 20h avec des agonistes de LXR/RXR (5  $\mu$ g/ml 22-hydroxy-cholesterol et 10  $\mu$ M 9-cis-retinoic acid) et du LPS (100 ng/mL) dans du MCI contenant 0,2% BSA. Il faut préciser que du PMA est ajouté sur les macrophages THP-1 pendant toute cette procédure afin de s'assurer du maintien de la différenciation et d'une bonne viabilité cellulaire. Après l'équilibration, les macrophages (J774 et THP-1) exprimant ABCA1 sont incubées en présence de 15  $\mu$ g/mL d'apolipoprotéine A1

(Sigma AALdrich) pendant 4h. Les surnageants récupérés sont centrifugés à 1200 rpm pendant 5 min pour éliminer les débris cellulaires avant ajout de 4mL du liquide scintillant. En parallèle, le tapis cellulaire des plaques est incubé avec 600 µL d'isopropanol afin d'extraire tout le cholestérol tritié intracellulaire sur lequel est ajouté du liquide scintillant.

Tous les échantillons ont été analysés en triplicats. Les différentes plaques sont ensuite lues par un compteur de radioactivité. L'efflux de cholestérol a été évalué comme le pourcentage de la radioactivité dans le milieu par rapport à la radioactivité totale dans le milieu de culture et ceux contenant les cellules. Les valeurs d'efflux de cholestérol ont été corrigées par la quantité de cholestérol tritié libéré dans le milieu en l'absence d'accepteurs (Apo A1).

### **1.2.2. Dosage d'eicosanoïdes de surnageants cellulaires**

Cette étape est réalisée en parallèle des expériences de mesure d'efflux du cholestérol. Les deux lignées cellulaires J774 et THP-1 sontensemencées dans un MCC respectivement à hauteur de 200000 cellules par puits et 4 millions de cellules par puits dans des plaques de 6 puits. Au total 9 puits par condition sontensemencés et feront l'objet de différents traitements après confluence. Il est important de préciser qu'au moment de l'ensemencement, du PMA (100nM) est ajouté au milieu de culture des cellules THP-1 pour favoriser leur différenciation en macrophages. Après confluence (au bout de 72 h), les cellules sont supplémentées ou non par de l'EPA (70µm) dans MCC pendant 30h. Le milieu de culture utilisé pour la supplémentation de l'EPA contient du BSA (64 mg pour les 100 mL de milieu de culture) pour faciliter le transport de l'EPA dans la membrane des cellules [302]. Ensuite les cellules sont stimulées ou non par le LPS (100ng/mL) dans du MCI contenant 0,2% de BSA et des agonistes de LXR/RXR (5 µg/ml 22-hydroxy-cholesterol et 10 µM 9-cis-retinoic acid) pendant 24h. En effet, ces agonistes permettent une surexpression de ABCA1 [5]. L'objectif est de se rapprocher des conditions de traitements appliqués aux cellules pour la mesure de l'efflux du cholestérol (**Partie II-Chapitre 5-1.2.1**). A l'issue des 24h, les surnageants sont ensuite récupérés dans des tubes à hémolyse contenant du milieu de culture avec 0.005% de BHT (m/v) puis vortexés avant leur congélation à -32°C jusqu'à leur extraction. Les plaques contenant les tapis cellulaires ont ensuite servi au dosage des protéines cellulaires suivant le protocole de Peterson [303]. Les surnageants après décongélation sont vortexés, puis extrait suivant la méthode optimisée développée sur la cartouche Strata™-X. Après préconcentration des extraits et évaporation, ils sont repris par 100 µL d'un mélange d'étalon interne à 25 ng/mL (6-Céto PGF1α-D4, LTB4-D4 et 15(S)-HETE-D8). En parallèle, une gamme d'étalonnage s'étalant sur 8 niveaux de concentrations sur colonne correspondant respectivement à 2.5 ; 12.5 ; 25 ; 125 ; 250 ; 1250 ;

2500 et 12500 pg. A chaque point de gamme, il a été ajouté 125 pg d'un mélange d'étalons internes (6-Céto-PGF1 $\alpha$ -D4; LTB4-D4 ; 15(S)-HETE-D8). Chaque point de gamme et échantillon ont été analysés en triplicat par notre méthode RP-HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) en mode DDA segmenté. Après extraction des ions spécifiques (ion de quantification) des eicosanoïdes cellulaires sous X Calibur™, la quantité obtenue pour chaque eicosanoïde est normalisée par la quantité de protéine correspondante au traitement appliqué.

## **2. Résultats et Discussion**

### **2.1. Evaluation de l'efflux du cholestérol sur deux modèles de macrophages :**

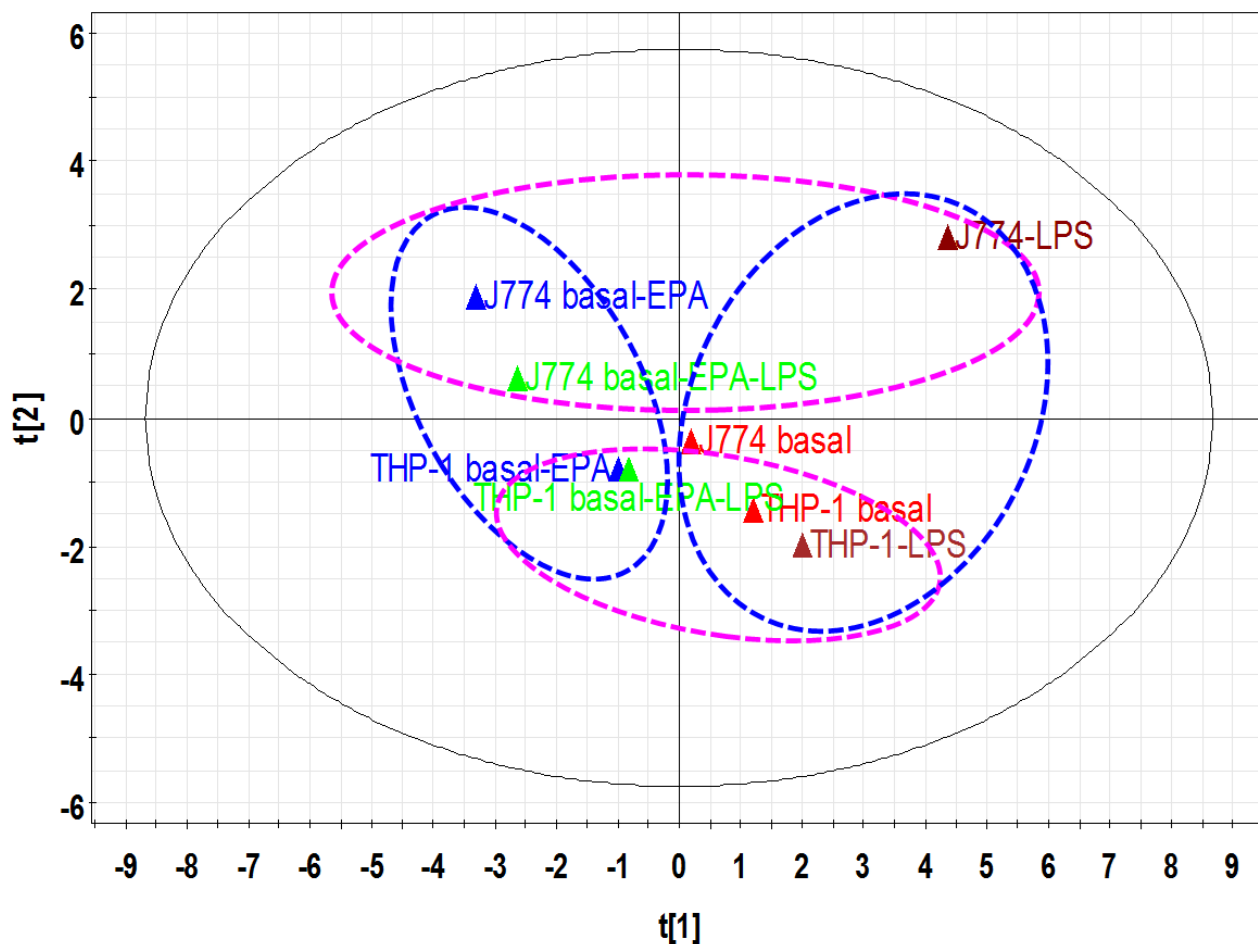
#### **J774 et THP-1**

Nous évaluons ici l'impact de l'incorporation de l'EPA sur l'efflux du cholestérol des macrophages (J774 et THP-1) non surchargés en cholestérol. Suivant ces résultats (**Annexe V-6**), l'EPA stimule l'efflux de l'ordre de 30% à l'état basal et de 35% en condition inflammatoire des macrophages THP-1 non surchargés en cholestérol. L'augmentation de l'efflux du cholestérol suite à la supplémentation en EPA a récemment été rapportée chez les macrophages THP-1 non surchargés [298]. La réduction de l'efflux de 17% à l'état basal des macrophages J774 (**Annexe V-6**) confirme les résultats rapportés en 2016 [35]. En revanche en condition inflammatoire, l'efflux de cholestérol des macrophages J774 est stimulé de l'ordre de 49% (**Annexe V-6**). Le mécanisme qui sous-tend cette augmentation d'efflux n'est pas bien décrite dans la littérature. Des expériences de supplémentation en EPA de la membrane de macrophages THP-1 non surchargés suivies de différents tests d'inhibition de voies possibles ont permis de montrer que l'activité d'ABCA1 serait liée à plusieurs mécanismes [298]. Parmi ces mécanismes qu'il est possible d'explorer, il y a l'impact ou non des eicosanoïdes sur la phosphorylation de la protéine d'efflux ABCA1. Nous allons donc nous intéresser dans le paragraphe ci-dessous à la quantification des eicosanoïdes produits par les macrophages à l'état basal ou stimulé par le LPS avant et après incorporation de l'EPA dans leurs membranes.

## **2.2. Analyse quantitative des eicosanoïdes produits par les macrophages J774 et THP-1 non surchargés en cholestérol**

En parallèle de l'évaluation de l'efflux comme décrit ci-dessus, notre méthode couplée RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) en mode DDA segmenté, a permis de suivre spécifiquement et de doser environ 15 molécules (6-Céto PGF1 $\alpha$  ; TXB2 ; PGE3 ; PGF2 $\alpha$  ; PGE2 ; LXA4 ; LTD4 ; LTB4 ; 14,15-DiHETE ; 13-HODE ; 9-HODE, 15-HETE ; 11-HETE ; EPA ; AA) suivant les conditions de stimulation. Parmi ces molécules, deux molécules sont issues de la voie non enzymatique/COX ayant pour précurseur l'acide linoléique (13-HODE et 9-HODE), cinq sont des prostanoides issus de la voie des COX (6-Céto PGF1 $\alpha$  ; TXB2 ; PGE3 ; PGF2 $\alpha$  ; PGE2), et cinq sont issues de la voie des LOX (LTD4 ; LTB4 ; 14,15-DiHETE ; 15-HETE ; 11-HETE). L'ensemble des voies de biogenèse possible sont regroupées suivant la figure rapportée à l'**Annexe V-7**.

Une analyse en composantes principales à partir des données quantitatives des oxylipines relarguées par les macrophages J774 et THP-1 a été réalisée (**Fig.76**). La première (PC1) et la deuxième (PC2) composantes de l'ACP représentent environ 70 % de la variance expliquée par le modèle. La PC1 (48%) permet de séparer les cellules supplémentées en EPA de celles à l'état basal ou uniquement stimulées par le LPS. La PC2 (21%) permet de regrouper les échantillons en termes de lignées cellulaires (J774 et THP1).



SIMCA-P+ 12.0.1 - 2022-05-20 14:43:43 (UTC+1)

**Figure 76: Analyse en composantes principales des données quantitatives des macrophages non surchargés en cholestérol dans différentes conditions de culture**

PC1(48%) et PC2 (21%). Les macrophages ont été incubés pendant 24 heures indépendamment du traitement. En bleu : les macrophages J774 et THP1 supplémentés par l'EPA uniquement, en vert : les macrophages J774 et THP-1 supplémentés par l'EPA et stimulés par le LPS (100ng/mL); en café : les macrophages J774 et THP1 stimulés uniquement par le LPS (100ng/mL); et en rouge : les macrophages J774 et THP-1 à l'état basal

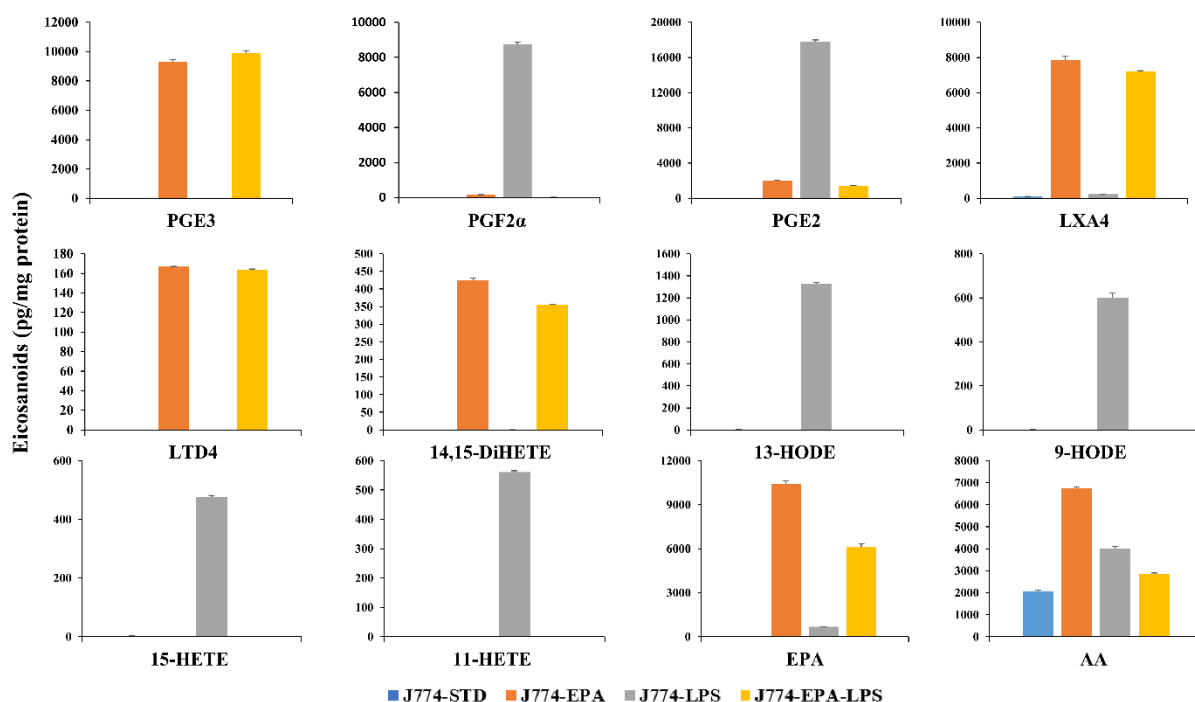
Sur les 15 molécules détectées dans les surnageants des macrophages J774 et THP-1 non surchargés en cholestérol, seules 12 ont pu être quantifiées. Certaines oxylipines ne sont produites en quantité significative que sous stimulation du LPS (PGF2 $\alpha$ , PGE2,15-HETE, 11-HETE) tandis que d'autres n'augmentent de manière exponentielle qu'après supplémentation avec de l'EPA et/ ou stimulation par le LPS (PGE3, LXA4, LTD4, 14,15-DiHETE) suivant les **figures 77 et 78**. Certaines oxylipines comme le LTB4 et le 5-HETE étaient produits mais à une quantité inférieure au LOQ. Après supplémentation par l'EPA et sous stimulation par le LPS, on note une diminution de la TXB2, la PGF2 $\alpha$  et la PGE2 pour les deux types cellulaires

par rapport aux états basaux (état basal et état supplémenté par l'EPA uniquement). En revanche, certains eicosanoïdes comme la PGE3, le LXA4, le LTD4 et la 14,15-DiHETE augmentent uniquement de façon significative qu'après supplémentation par l'EPA seul ou suivi d'une stimulation des deux modèles cellulaires (J774 et THP-1). Pour tenter d'expliquer les variations des molécules dosés dans les surnageants, il est nécessaire de les classer par précurseur et de comprendre les voies de biogenèse possibles. A l'exception de la PGE3 et de la 14,15-DiHETE qui sont issus de la PGE3, tous les eicosanoïdes dosés sont issus de l'AA. L'enrichissement de la membrane cellulaire en EPA (pouvant être engagé dans les différentes voies de biogenèse des oxylipines) expliquerait donc l'augmentation de la PGE3 et du 14,15-DiHETE. L'augmentation de la LXA4 et du LTD4 suite à la supplémentation par l'EPA contrairement à ce qui pouvait être attendu, serait due au remodelage de Lands [91,304–306] qui libérerait de l'AA pour leur production. La comparaison des quantités d'AA des deux macrophages (**Fig.77** et **78**) quel que soit l'état de traitement permet de dire que les macrophages J774 semblent plus riches en AA dans leur membrane que les THP-1. Si certaines variations de quantités dans différentes conditions de culture cellulaire sont interprétables, d'autres en revanche le sont moins (cas des variations du 9-HODE et de 15-HETE chez les macrophages THP-1 non surchargés en cholestérol). En effet, les mécanismes de signalisations impliqués dans les différentes voies de biogenèse des eicosanoïdes cellulaires sont très complexes.

Comme évoqué dans un précédent paragraphe (**Partie II-Chapitre V-2.1**), l'EPA stimule l'efflux chez les deux types de macrophages J774 et THP-1 après une supplémentation en EPA et en condition inflammatoire respectivement de 49% et 35%. Une analyse de l'ensemble des résultats (**Fig.77** et **78**) permet de se rendre compte que seuls quatre eicosanoïdes (PGE3, LXA4, LTD4 et 14,15-DiHETE) augmentent après une supplémentation des macrophages J774 et THP-1 en EPA et sous stimulation par le LPS. Notre analyse quantitative permet donc de dire que ces quatre molécules seraient probablement à l'origine de la stimulation de l'efflux du cholestérol observé chez les macrophages. En croisant l'ensemble des résultats des deux macrophages, l'on pourrait dire que la PGE3, la lipoxine A4, la 14,15-DiHETE et la LTD4 seraient de possibles biomarqueurs impliqués dans l'effet antiathérogène observé sur l'efflux du cholestérol après supplémentation de la membrane des macrophages par l'EPA. Ces observations semblent se confirmer au travers du loading plot des données quantitatives des deux macrophages dans différentes conditions (**Annexe V-8**) dans la mesure où l'augmentation de l'efflux du cholestérol semble corrélée avec l'augmentation de la PGE3, la LXA4, le LTD4,

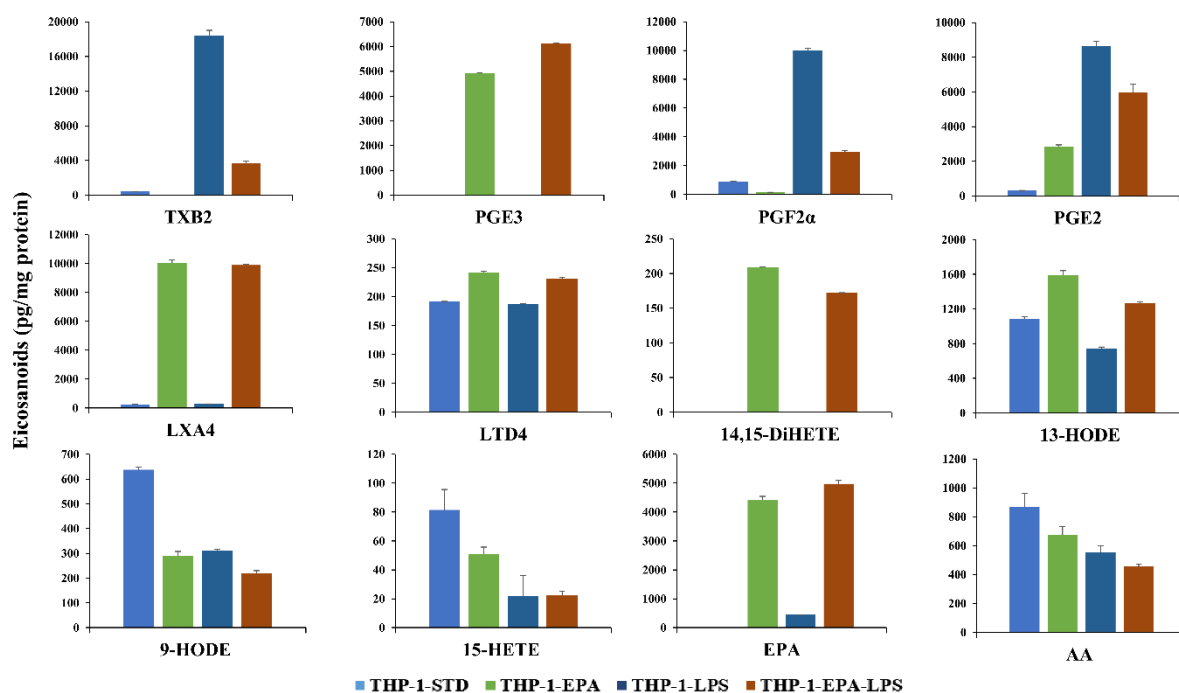


le 14,15-DiHETE et l'EPA. D'ailleurs, une étude dose-dépendante réalisée sur des macrophages THP-1 surchargés en cholestérol a permis de montrer une corrélation directe entre l'augmentation de la lipoxine A4 (LXA4) et la surexpression de l'ABCA1 à partir du facteur transcriptionnel LXR $\alpha$  [307]. La surexpression de l'ABCA1 se traduit par une sortie plus importante de cholestérol, réduisant ainsi la probabilité de formation de cellules spumeuses, comme rapporté dans la littérature [5].



**Figure 77: Evaluation quantitative des oxylipines et AGPI produits par les macrophages J774 dans différentes conditions de traitements.**

Les quantités de molécules sont rapportées au mg de protéines présent dans la plaque après récupération des surnageants. Toutes les cellules ont été incubées à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24h indépendamment du traitement appliqué. STD correspond à l'état standard ou basal, LPS correspond à une stimulation par le LPS, EPA indique une supplémentation par l'EPA et EPA-LPS correspond à une supplémentation des cellules par l'EPA et une stimulation par le LPS.



**Figure 78: Analyse quantitative des oxylipines et AGPI produits par les macrophages THP-1 dans différentes conditions de traitements.**

Les quantités de molécules sont rapportées au mg de protéines présent dans la plaque après récupération des surnageants. Toutes les cellules ont été incubées à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24h indépendamment du traitement appliqué. STD correspond à l'état standard ou basal, LPS correspond à une stimulation par le LPS, EPA indique une supplémentation par l'EPA et EPA-LPS correspond à une supplémentation des cellules par l'EPA et une stimulation par le LPS.

## Conclusion

Notre méthode RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) a permis de réaliser une comparaison du métabolisme des eicosanoïdes de deux types cellulaires (J774 et THP-1). Nos résultats confirment l'efficacité du LPS pour stimuler la production des oxylipines [85,89,93,95]. En effet, la stimulation par le LPS des deux modèles cellulaires J774 et THP-1 montre une production en oxylipines dépendante du temps de stimulation. Les profilages suivant notre approche ciblée sur 26 molécules semblent donner une orientation de type cellulaire à choisir en fonction des molécules ciblées pour l'exploration d'une pathologie. Les THP-1 semblent avoir un profil en faveur des prostanoïdes mais aussi en espèces oxydées, à la différence des macrophages J774 qui orientent leur métabolisme vers plus de LT et espèces oxydées apparentés. En résumé, les THP-1 peuvent valablement être utilisés comme modèle inflammatoire d'étude des prostanoïdes et les J774 pour l'étude des autres espèces d'eicosanoïdes. En revanche, cette observation est à nuancer si l'on prend en compte le large panel de médiateurs lipidiques produits par les macrophages J774 et THP-1 et détectés via la

méthode Shimadzu développée sur le LCMS-8060. Cette approche sur la base de 195 médiateurs lipidiques sur la LCMS-8060 a permis de montrer que les macrophages J774 et THP-1 produisent entre 32 et 77 médiateurs lipidiques dépendant des conditions de stimulations. Les macrophages J774 à l'état stimulé par le LPS pendant 24 heures semblent montrer un métabolisme plus actif comparativement aux autres conditions. Enfin, nos résultats d'évaluation de l'efflux chez les macrophages J774 et THP-1 confirment ceux de la littérature en ce qui concerne l'augmentation de l'efflux suite à l'incorporation de l'EPA dans les membranes de macrophages [35,298]. La variation quantitative de certains eicosanoïdes semble corrélée à la variation de l'efflux du cholestérol. Sur cette base, quatre eicosanoïdes (la PGE3, la LXA4, le LTD4, et le 14,15-DiHETE) seraient impliqués dans l'effet antiathérogène observé suite à la supplémentation en EPA.

## **Partie III: Discussion et conclusion générale**

Les eicosanoïdes sont connus depuis très longtemps pour leur implication dans les maladies inflammatoires. L'analyse quantitative des eicosanoïdes est un atout majeur pour les cliniciens dans l'orientation du diagnostic de plusieurs maladies inflammatoires à l'instar de l'athérosclérose. Cependant, l'évaluation quantitative de ces métabolites est complexe, principalement en raison de leur diversité biologique et de leurs similarités structurales.

Dans cette étude, un développement a été mené pour tenter de résoudre les difficultés de séparation des eicosanoïdes en RP-HPLC telles que rapportées dans la littérature [51,87,116,148,257]. La structure proche des eicosanoïdes a orienté notre approche vers un choix réfléchi de phases stationnaires (au total sept) de sélectivité prédite différente en se basant sur le modèle HSM. Sur la base de critères d'efficacité des phases stationnaires et d'optimisation de la sélectivité des 7 phases stationnaires (sélectivité de séparation des eicosanoïdes, le « time needed » et la capacité de pic par minute), la phase stationnaire Accucore™ C30 s'est montrée la plus adaptée à la séparation des isomères et isobares d'eicosanoïdes. En effet, la phase Accucore™ C30 offre une meilleure sélectivité globale entre certaines espèces et un temps d'analyse relativement court [270] comparativement à de nombreux travaux d'analyse des eicosanoïdes [39,133,214]. Plusieurs autres systèmes de sélection de colonnes tels que rapportés dans la littérature auraient pu être utilisés. La plupart de ces modèles de sélection de colonnes évaluent la sélectivité des phases stationnaires par calcul du facteur de rétention par rapport à une molécule de référence [198]. Ces molécules de référence sont volatiles et ne peuvent être analysées par un détecteur d'aérosol chargé (Corona CAD®) qui a servi à notre développement de méthodes en chromatographie liquide. Par conséquent, un recours a été fait au modèle HSM du fait qu'il s'appuie sur une abondante base de données d'environ 751 colonnes avec leur valeur de sélectivité prédite qui s'y rattache [197]. La sélectivité prédite globale pour les phases stationnaires suivant le modèle HSM est évaluée par rapport au facteur de rétention de l'éthylbenzène. En effet, il s'agit d'une molécule qui permet de faire abstraction de l'interaction hydrophobe des phases stationnaires afin de mettre en valeur la contribution des autres types d'interactions (interaction liée à l'encombrement stérique, liaisons hydrogène, interaction d'échange d'ions) qui contribuent à différencier les phases stationnaires du point de vue sélectivité.

Les phases stationnaires avec GPI de notre étude sont moins performantes à la séparation de certains isomères et isobares d'eicosanoïdes du fait de nombreuses co-élutions de molécules à l'instar de la TXB1 et la TXB2. La co-élution de TXB1 et TXB2 semble être due à une sélectivité stérique insuffisante des phases stationnaires avec GPI pour différencier ces deux

molécules. Les facteurs qui sont susceptibles d'intervenir dans la reconnaissance stérique de solutés sont : la géométrie et la longueur de la chaîne carbonée d'un soluté, la densité de greffage [169], la longueur de la chaîne carbonée greffée [308], la composition de phase mobile et la température [273]. Parmi ces facteurs, seule la composition de la phase mobile ne semble pas influencer significativement sur la reconnaissance de forme [170]. En règle générale, on sait que les phases polymériques offrent une meilleure reconnaissance de forme [169,309] du fait de leur densité de greffage plus importante [310,311]. Eu égard au fait que les phases polymériques ont en général une plus grande densité de greffage induisant un encombrement stérique opposé à la pénétration de solutés, les phases monomériques sont qualifiées par une sélectivité de forme plus faible par rapport aux phases polymériques [170]. De plus, la sélectivité liée à la forme augmente au fur et à mesure que la longueur de la chaîne greffée augmente [308]. L'on peut donc aisément imaginer que la reconnaissance stérique serait plus importante pour Accucore™ C30 par rapport à nos phases greffées C18. Un autre critère qu'il est important de prendre en compte dans la résistance stérique à la pénétration dans les greffons est la taille des molécules prises individuellement. Les eicosanoïdes étant des acides gras polyinsaturés, cela laisse penser aux multiples conformations que prennent ces derniers au contact des greffons. Une séparation efficace n'est donc possible que s'il y a une reconnaissance stérique suffisante par les greffons d'une phase stationnaire. L'inclusion de phases polymériques dans cette étude permettrait de conclure en ce qui concerne la sélectivité de forme des phases stationnaires (monomériques *versus* polymériques) vis-à-vis des eicosanoïdes.

Si le nombre d'insaturations est un facteur important pour la discrimination de certains eicosanoïdes comme la TXB2 et la TXB1, le mécanisme de rétention semble dépendre également de la position de certains groupements polaires tels que les hydroxyles par rapport au carboxyle. Une étude de Blewett, *et al.* a permis de montrer que la rétention augmente au fur et mesure que le groupement hydroxyle des HETE est proche du groupement carboxyle [247]. Sachant que les HETE ont le même nombre d'insaturations et ne diffèrent que par la position des insaturations et surtout de la position de l'hydroxyle, l'on pourrait être amené à penser que, plus le groupement hydroxyle de la chaîne carbonée est proche du groupement carboxyle, et plus la partie de la chaîne carbonée pouvant interagir avec les greffons est importante. Il en résulte une rétention plus importante du 5-HETE par rapport au 15-HETE quel que soit la phase stationnaire. En raison de l'encombrement stérique des greffons des phases stationnaires, il est exclu que le groupement hydroxyle et carboxyle des HETE puissent interagir simultanément

avec deux sites polaires tels les silanols résiduels ou les GPI. En revanche, dans le cas où les deux groupements fonctionnels (hydroxyle et carboxyle) sont vicinaux, il est probable que l'interaction polaire soit favorisée. Cette potentialité d'interactions polaires favorisant la séparation des eicosanoïdes sur les phases stationnaires avec GPI ne s'est cependant pas concrétisée dans notre étude.

Une meilleure sélectivité de séparation des isomères HETE sur Accucore™ C30 a été obtenue par rapport à celle réalisée sur une phase stationnaire C18 (2.1 × 250 mm; Grace-Vydac, Deerfield, IL) [133] et sur Luna C18 (150 x 2 mm, 5µm) [285]. Cependant de nombreuses co-élutions persistent à l'instar de la 6-Céto PGF1α et la PGI2, la 8-HETE et la 12-HETE et bien d'autres [270].

Pour résoudre la séparation des espèces co-éluées en RP-HPLC, les performances de quatre phases à polarité de phases normale ont été explorées. Parmi les quatre phases stationnaires de chimie différente (Silice, Cyano, NH<sub>2</sub>), la phase stationnaire Hypersil Gold™ CN a montré une meilleure séparation globale des eicosanoïdes. Cette phase stationnaire a permis de séparer certaines espèces co-éluées en RP-HPLC comme : le 6-Céto PGF1 et la PGI2 ; le 12-HETE et le 8-HETE jamais séparés dans la littérature ; le 14,15-DiHETE et le LTB4. En revanche, la sélectivité globale obtenue en RP-HPLC avec Accucore C30™ est nettement meilleure par rapport à celle obtenue en NP-HPLC avec Hypersil Gold™ CN. De nombreuses espèces moléculaires bien séparées en RP-HPLC sont mal résolues voire co-éluées en NP-HPLC. Notre séparation en NP-HPLC est non seulement 10 fois plus rapide mais montre aussi une meilleure sélectivité comparée aux travaux de Powell, *et al.* [143]. Une complémentarité entre la NP-HPLC et la RP-HPLC dans l'analyse des eicosanoïdes se dégage ainsi de notre étude. Au vu du critère impératif de miscibilité des solvants utilisés dans le cadre d'un couplage on-line pour en faire une méthode bidimensionnelle en chromatographie liquide, la nature des solvants de nos deux méthodes (NP-HPLC et RP-HPLC) oriente vers un couplage en off-line. Cette approche permettrait *in fine* d'améliorer la fiabilité de la quantification de certains isobares mal séparés en RP-HPLC mais aussi d'augmenter la sensibilité pour une quantification ciblée de certains biomarqueurs présents à l'état de traces. Cependant, ce couplage off-line de la NP-HPLC à la RP-HPLC risque de se confronter aux problèmes de perte d'échantillons inhérents aux techniques de préparation d'échantillons et des problèmes d'oxydation.

Des milieux de culture contenant du BSA semblent stabiliser les médiateurs lipidiques [132]. Nos protocoles de culture cellulaire contenaient du BSA et nous ont probablement permis de stabiliser certaines molécules dosées dans cette étude. Cependant, la différence significative de

niveau de stabilité dépend de la structure des molécules [132] : il faudrait des conditions particulières lorsque certaines familles de molécules font l'objet d'étude ciblée. En revanche, il existe certaines espèces comme la PGI<sub>2</sub> et la TXA<sub>2</sub> très instables et qui se convertissent très rapidement *in vivo* respectivement en 6-Céto PGF<sub>1α</sub> et le 11-Déhydro TXB<sub>2</sub> utilisés pour la validation de méthodes dans les échantillons biologiques [247]. De plus, nombre de molécules se dégradent vite et/ ou répondent très mal. Parmi celles qui se dégradent vite, on peut citer entre autres : la PGI<sub>2</sub> le plus instable au cours de notre développement, la TXB<sub>2</sub> et le 5,6-DiHETE. Toutefois, ces risques d'oxydations liées à la structure des molécules et aux techniques de préparation et d'analyse peuvent être minimisés par l'automatisation d'un système de récolte de l'éluat en sortie de la NP-HPLC ainsi que l'évaporation sous flux d'azote dans un bain marie à atmosphère contrôlé.

La détection des eicosanoïdes dans les matrices biologiques représente un défi analytique. En effet, leur quantité de l'ordre du picomolaire au nanomolaire complique leur détection dans les échantillons cellulaires et fluides biologiques [87,108,300]. Le triple quadripôle en mode MRM est couramment utilisé pour l'analyse des eicosanoïdes. Malgré la très bonne spécificité et la sensibilité qu'offre le mode MRM, quelques insuffisances peuvent être mises en exergue. En effet, dans le cadre de l'analyse d'échantillons cellulaires, il est courant de voir sur des TIC (Total Ion Chromatogram), plusieurs signaux (pics chromatographiques) à différents temps de rétention pour une transition donnée. S'il est relativement simple de faire usage du temps de rétention pour extraire l'information souhaitée, cette approche n'est pas pertinente quand la matrice de l'échantillon induit une instabilité des temps de rétention. De plus, la contribution isotopique peut aboutir dans certains cas à obtenir des signaux correspondant à des transitions recherchées au cours de l'acquisition alors que la molécule recherchée n'est pas présente. Pour se prémunir d'une mauvaise annotation de pics, il est donc nécessaire d'avoir accès au spectre de fragmentation MS<sup>2</sup>. Contrairement au mode MRM, le mode DDA permet un accès rapide au spectre de fragmentation de chaque molécule dans chaque échantillon. Ce spectre de fragmentation qui est la signature moléculaire de chaque composé permet de confirmer l'identité de la molécule sans ambiguïté. En revanche, le mode DDA est moins sensible que le mode MRM. Un suivi des molécules par SRM sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro s'est avéré infructueux du fait d'une fréquence d'acquisition et une sensibilité insatisfaisante. Le mode DDA avec fragmentation par CID n'a pas fait l'objet d'exploration en raison de sa moindre sensibilité. Une segmentation du profil chromatographique et une acquisition en mode DDA avec fragmentation par HCD sur le LTQ-Orbitrap® Velos Pro a permis d'atteindre une



fréquence d'acquisition satisfaisante de l'ordre de 2 Hz pour suivre l'ensemble des 26 molécules. Ces limites de détection de l'ordre du pg ont été atteintes et s'avèrent meilleures par rapport à certaines [290,291] ou comparables à d'autres obtenues sur un TQ en mode MRM [65,133]. Au vu de tous ces résultats, le mode DDA avec segmentation du profil chromatographique peut être considéré comme une alternative au MRM pour le suivi d'isobares et d'isomères d'eicosanoïdes. En revanche, au vu des difficultés pour obtenir une fréquence d'acquisition satisfaisante, la vitesse d'acquisition du spectromètre de masse LTQ-Orbitrap® Velos Pro est insuffisante pour suivre un nombre relativement élevé de molécules. Ces observations sont en conformité avec celles rapportées dans les travaux de Zubarev et Makarov [242] dans lesquels le nombre d'ions suivis par MRM dans les systèmes de type triple quadripôle ou Q-TOF est respectivement 2 à 5 fois plus important comparé à un couplage quadripôle à l'Orbitrap®. De nouveaux modèles tel que l'Orbitrap® Eclipse Tribrid ou la Q exactive offrent une vitesse d'acquisition plus importante [294,312] et permettrait de suivre un nombre plus important de molécules.

La méthode développée en RP-HPLC-LTQ-Orbitrap® Velos Pro a ensuite été utilisée pour l'évaluation des performances d'extraction des eicosanoïdes par 7 cartouches de SPE. Ces optimisations ont permis de choisir la phase stationnaire Strata™-X du fait de son meilleur rendement en oxylipines de l'ordre de 93% et pour des raisons de coût d'analyse. Le caractère hydrophobe plus important des phases stationnaires polymériques de SPE (Oasis® HLB et Strata™-X) expliquerait ces bons rendements obtenus par rapport aux phases classiques de type C18 (Diazem ; Supelclean™ LC-18 et Strata® C18-E). En effet, le taux de greffage des phases polymériques est plus important mais se confronte à des problèmes de reproductibilité [168]. Certaines phases classiques notamment Bond Elut et Bond Elut-OH se démarquent du reste des phases classiques par de bons rendements d'extraction voire comparables à ceux des phases polymériques. D'ailleurs, les performances comparables des cartouches Bond Elut, Oasis® HLB et Strata™-X pour l'extraction du LTE4 et du 12-HETE, voire du 2,3-dinor TXB2 ont été rapportées dans la littérature [130]. Les rendements comparables des cartouches Bond Elut (avec endcapping) et Bond Elut-OH (sans endcapping) montrent que l'endcapping n'influence pas leur rendement d'extraction en eicosanoïdes.

L'ajout de l'acide n'a pas amélioré nos rendements d'extractions. Une amélioration du rendement en extraction des prostaglandines a été obtenue en faisant abstraction de l'usage d'acide dans le protocole [313].

Par ailleurs, notre étude montre de meilleurs rendements pour la SPE par rapport à la LLE pour l'extraction des oxylipines. En revanche, quelle que soit la phase stationnaire utilisée, nos cartouches de SPE présentaient de faibles rendements d'extraction en AGPI allant de 40 à 60%. Une alternative pour augmenter le rendement d'extraction en AGPI serait après l'étape de lavage, de faire un second lavage avec l'éther de pétrole suivi d'une élution avec un mélange d'éther de pétrole-chloroforme (65 :35, v/v) comme réalisé dans les travaux de Powell [314]. Aussi, le formiate de méthyle comme solvant d'élution semble donner de meilleurs résultats dans divers travaux [141,145,235,285] mais ne semble pas efficient pour l'extraction des cystéinyl-leucotriènes [131]. Suivant notre étude, un séchage de la cartouche sous flux d'azote avant élution avec le formiate de méthyle en association ou non avec l'acétonitrile ou le méthanol permettrait d'améliorer le rendement d'extraction des eicosanoïdes y compris les cystéinyl-leucotriènes.

Enfin, malgré le plein essor de la SLE (Supported Liquid Extraction) [301] comme technique d'extraction de médiateurs lipidiques, son mécanisme n'est pas très bien décrit, laissant place à la SPE comme la technique efficiente pour l'extraction des eicosanoïdes.

La cartouche Strata™-X sélectionnée, a permis de réaliser l'extraction des eicosanoïdes produits par deux lignées de macrophages J774 et THP-1 dans différentes conditions de stimulation. A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature d'étude de profilage d'oxylipines produites par les macrophages J774 et THP-1. Les résultats rapportés dans ce travail de thèse montrent que le LPS contribue à une production plus importante d'oxylipines. L'exploration du profil en oxylipines sur la base de notre approche ciblée sur les 26 molécules a permis d'orienter les macrophages J774 vers un modèle approprié pour l'étude de pathologie impliquant les espèces oxydées telles que les HETE, les EET, les HODE à la différence des THP-1 qui constitueraient un modèle de choix pour l'étude de prostanoïdes comme biomarqueurs de certaines maladies inflammatoires. Sur la base d'une méthode en mode SRM sur la LCMS-8060, un profilage plus exhaustif en médiateurs lipidiques a été rapporté pour la première fois dans la littérature pour les deux lignées de macrophages. En revanche, les variations atypiques de production constatées pour certaines molécules comme la PGE3, la PGE2 et les HODE pourraient s'expliquer par l'existence de mécanismes complexes impliquant un rétrocontrôle négatif [94,96] et les ions superoxydes et radicaux libres (tel que NO) [97]. Ces phénomènes sont difficiles à contrôler. Pour ce faire, une étude dose dépendante du LPS en parallèle de l'évaluation de la viabilité cellulaire aurait pu être menée pour définir la concentration de LPS à utiliser. Cette dernière approche permettrait d'amoindrir la genèse

d'ions superoxydes et de radicaux libres mais sera sans impact sur un éventuel rétrocontrôle sur l'activité de la cyclooxygénase. Une meilleure compréhension du profilage de l'ensemble de ces oxylipines passe par une étude cinétique mais les multiples voies possibles pour obtenir chaque molécule finale rendrait difficile les interprétations. Notre étude fournit une compréhension sur le métabolisme des eicosanoïdes de deux types de macrophages J774 et THP-1. Cette étude montre que le profil en eicosanoïdes diffère entre les différents phénotypes de macrophages à savoir J774 et THP-1, confirmant ainsi les données de la littérature [86]. De plus, l'incorporation d'AGPI notamment l'EPA et la stimulation par le LPS montre la façon dont ce métabolisme est impacté. Un modèle chronique de supplémentation en EPA de la membrane des macrophages J774 et THP-1 non surchargés en cholestérol montre une augmentation significative de l'efflux du cholestérol. Le mécanisme moteur de cette sortie de cholestérol reste flou à ce jour dans la littérature. Des expériences d'inhibition des deux principales voies (COX et LOX) des eicosanoïdes chez les macrophages non surchargés THP-1 ont permis de déduire une absence de lien directe entre la variation d'efflux observée et les eicosanoïdes [298]. En revanche, des expériences d'inhibition simultanée des deux voies n'ont pas été menées pour écarter complètement cette hypothèse. En effet, c'est la balance globale entre plusieurs espèces d'eicosanoïdes [66] à effets d'oppositions et/ ou de redondance qui activent les différentes voies de signalisations cellulaires s'il y a lieu [67]. Aussi, Les médiateurs lipidiques sont des molécules possédant généralement des actions puissantes à de très faibles concentrations [102], donc la seule présence d'une molécule peut déclencher une signalisation cellulaire. De plus, il subsiste une voie non enzymatique de biogenèse des eicosanoïdes après inhibition de la voie enzymatique. Des eicosanoïdes issus de la voie non enzymatique peuvent dériver en d'autres eicosanoïdes qui pourraient être impliqués dans la variation de l'efflux du cholestérol. Aussi, suivant une étude rapportée sur des macrophages THP-1 surchargés en cholestérol uniquement, des prostanoïdes (PGE2, PGD2) stimulent l'expression de l'ABCA1 et de la cholestérol 27 $\alpha$ -hydroxylase (enzyme-clé de la transformation du cholestérol en acides biliaires) [315]. L'impact de l'EPA sur une modification quantitative des prostanoïdes a été montré dans une lignée de macrophages murins RAW 264.7 avec une diminution de la PGE2 et une augmentation des PGE3 et PGD3 [38,55]. Enfin, quatre potentiels biomarqueurs (PGE3 ; LXA4 ; 14,15-DiHETE et le LTD4) ont découlé de nos analyses quantitatives des deux lignées de macrophages non surchargés en cholestérol comme probablement corrélés à l'augmentation de l'efflux du cholestérol.

Nombre d'études peuvent être réalisées à l'issue de ces travaux pour approfondir nos résultats. Un développement en RP-HPLC devra être réalisé sur une phase polymérique suivi d'une comparaison de ces performances en termes de sélectivité de séparation des eicosanoïdes. Aussi, la reconnaissance stérique de ces phases vis-à-vis de la séparation de certains isomères et isobares d'eicosanoïdes comme la TXB1 et la TXB2 sera appréciée pour compléter nos observations sur les phases monomériques de notre étude. Il serait intéressant dans notre étude de voir en quoi la combinaison d'une stimulation rapide par les ionophores et une stimulation lente par les endotoxines comme dans les travaux de Buczynsky, *et al.*[85] peut augmenter les quantités d'oxylipines produites par les cellules. En vue d'extrapoler correctement nos observations sur l'implication des eicosanoïdes dans l'efflux de cholestérol dans l'athérosclérose chez l'Homme, une étude de profilage suivie de dosage des oxylipines des macrophages HMDM sera réalisée. L'évaluation de l'efflux sur un modèle de HMDM supplémenté par l'EPA puis stimulé par le LPS, en parallèle de la quantification des oxylipines permettra de vérifier les possibles biomarqueurs décrits dans ce travail de thèse. Cette première étude permettra de valider l'implication ou non des oxylipines comme décrit précédemment. Enfin, la même évaluation de l'efflux suivie de dosage des oxylipines devra être réalisée sur les trois lignées de macrophages (J774, THP-1 et HMDM) surchargés en cholestérol, supplémentés ou non en EPA et avec ou sans stimulation par le LPS. Le croisement de l'ensemble de ces données permettra de montrer l'implication ou non d'oxylipines dans l'efflux du cholestérol ABCA1 dépendant. Ces possibles biomarqueurs devront ensuite être validées par une étude dose dépendante sur l'expression et/ ou l'activité de l'ABCA1.

## **Références bibliographiques**

- [1] WHO Techn Rep. Ser., Classification of atherosclerotic lesions: report of a study group. World Health Organization, 1958.
- [2] R.B. Singh, S.A. Mengi, Y.-J. Xu, A.S. Arneja, N.S. Dhalla, Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process, *Exp Clin Cardiol.* 7 (2002) 40–53.
- [3] J.-L. Paul, B. Baudin, Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces, *Revue Francophone des Laboratoires.* 2009 (2009) 41–50. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(09\)70199-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(09)70199-6).
- [4] X.-H. Yu, Y.-C. Fu, D.-W. Zhang, K. Yin, C.-K. Tang, Foam cells in atherosclerosis, *Clinica Chimica Acta.* 424 (2013) 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.06.006>.
- [5] A.C. Li, C.K. Glass, The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention, *Nat Med.* 8 (2002) 1235–1242. <https://doi.org/10.1038/nm1102-1235>.
- [6] J. Shen, E. Herderick, J.F. Cornhill, E. Zsigmond, H.S. Kim, H. Kühn, N.V. Guevara, L. Chan, Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development, *J Clin Invest.* 98 (1996) 2201–2208. <https://doi.org/10.1172/JCI119029>.
- [7] T. Gautier, D. Masson, L. Lagrost, Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL), *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements.* 3 (2011) 267–272. [https://doi.org/10.1016/S1878-6480\(11\)70785-6](https://doi.org/10.1016/S1878-6480(11)70785-6).
- [8] E. Ikonen, Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9 (2008) 125–138. <https://doi.org/10.1038/nrm2336>.
- [9] T. Gautier, D. Masson, L. Lagrost, Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme, *EMC - Endocrinologie - Nutrition.* 7 (2010) 1–16. [https://doi.org/10.1016/S1155-1941\(10\)51260-5](https://doi.org/10.1016/S1155-1941(10)51260-5).
- [10] J.J. Repa, G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J.-M.A. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M.S. Brown, J.L. Goldstein, D.J. Mangelsdorf, Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ , *Genes Dev.* 14 (2000) 2819–2830. <https://doi.org/10.1101/gad.844900>.
- [11] Y.-W. Hu, X. Ma, X.-X. Li, X.-H. Liu, J. Xiao, Z.-C. Mo, J. Xiang, D.-F. Liao, C.-K. Tang, Eicosapentaenoic acid reduces ABCA1 serine phosphorylation and impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells, *Atherosclerosis.* 204 (2009) e35–e43. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.11.003>.
- [12] R.J. Aiello, D. Brees, P.-A. Bourassa, L. Royer, S. Lindsey, T. Coskran, M. Haghpassand, O.L. Francone, Increased Atherosclerosis in Hyperlipidemic Mice With Inactivation of ABCA1 in Macrophages, *ATVB.* 22 (2002) 630–637. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000014804.35824.DA>.
- [13] M. Van Eck, I.S.T. Bos, W.E. Kaminski, E. Orso, G. Rothe, J. Twisk, A. Bottcher, E.S. Van Amersfoort, T.A. Christiansen-Weber, W.-P. Fung-Leung, T.J.C. Van Berkel, G. Schmitz, Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 99 (2002) 6298–6303. <https://doi.org/10.1073/pnas.092327399>.
- [14] R.R. Singaraja, L.R. Brunham, H. Visscher, J.J.P. Kastelein, M.R. Hayden, Efflux and Atherosclerosis, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 23 (2003) 1322–1332. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000078520.89539.77>.
- [15] A. von Eckardstein, J.-R. Nofer, G. Assmann, High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 21 (2001) 13–27. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.21.1.13>.
- [16] N. Fournier, N. Attia, D. Rousseau-Ralliard, B. Védie, F. Destailats, A. Grynberg, J.-L. Paul, Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular*

- and Cell Biology of Lipids. 1821 (2012) 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.10.005>.
- [17] P.G. Yancey, A.E. Bortnick, G. Kellner-Weibel, M. de la Llera-Moya, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, Importance of Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux, *ATVB*. 23 (2003) 712–719. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000057572.97137.DD>.
- [18] A.R. Tall, Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins, *J Intern Med*. 263 (2008) 256–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01898.x>.
- [19] M.C. Phillips, Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux, *Journal of Biological Chemistry*. 289 (2014) 24020–24029. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.583658>.
- [20] M.C. Phillips, W.J. Johnson, G.H. Rothblat, Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 906 (1987) 223–276. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(87\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0304-4157(87)90013-X).
- [21] L.R. McLean, M.C. Phillips, Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles, *Biochemistry*. 20 (1981) 2893–2900. <https://doi.org/10.1021/bi00513a028>.
- [22] G.H. Rothblat, M.C. Phillips, Mechanism of cholesterol efflux from cells. Effects of acceptor structure and concentration., *Journal of Biological Chemistry*. 257 (1982) 4775–4782. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)34593-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34593-9).
- [23] W.J. Johnson, M.J. Bamberger, R.A. Latta, P.E. Rapp, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, The bidirectional flux of cholesterol between cells and lipoproteins. Effects of phospholipid depletion of high density lipoprotein., *Journal of Biological Chemistry*. 261 (1986) 5766–5776. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38448-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38448-X).
- [24] A. Pilon, S. Lestavel, G. Chinetti, J. Fruchart, B. Staels, V. Clavey, Rôles de SR-B1 et de ABCA1 dans le métabolisme des HDL et implication dans le développement de l'athérosclérose, *Le Courrier de l'Arcole et de La SFA*. (2001).
- [25] A. Braun, B.L. Trigatti, M.J. Post, K. Sato, M. Simons, J.M. Edelberg, R.D. Rosenberg, M. Schrenzel, M. Krieger, Loss of SR-BI Expression Leads to the Early Onset of Occlusive Atherosclerotic Coronary Artery Disease, Spontaneous Myocardial Infarctions, Severe Cardiac Dysfunction, and Premature Death in Apolipoprotein E-Deficient Mice, *Circulation Research*. 90 (2002) 270–276. <https://doi.org/10.1161/hh0302.104462>.
- [26] A.R. Tall, N. Wang, Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis, *J. Clin. Invest*. 106 (2000) 1205–1207. <https://doi.org/10.1172/JCI11538>.
- [27] I.C. Gelissen, M. Harris, K.-A. Rye, C. Quinn, A.J. Brown, M. Kockx, S. Cartland, M. Packianathan, L. Kritharides, W. Jessup, ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to ApoA-I, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 26 (2006) 534–540. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000200082.58536.e1>.
- [28] S. Rust, M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J.-C. Piette, J.-F. Deleuze, H.B. Brewer, N. Duverger, P. Denèfle, G. Assmann, Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1, *Nat Genet*. 22 (1999) 352–355. <https://doi.org/10.1038/11921>.
- [29] M. Bodzioch, E. Orsó, J. Klucken, T. Langmann, A. Böttcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Büchler, M. Porsch-Özcürümez, W.E. Kaminski, H.W. Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K.J. Lackner, G. Schmitz, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nat Genet*. 22 (1999) 347–351. <https://doi.org/10.1038/11914>.
- [30] A. Brooks-Wilson, M. Marcil, S.M. Clee, L.-H. Zhang, K. Roomp, M. van Dam, L. Yu, C. Brewer, J.A. Collins, H.O.F. Molhuizen, O. Loubser, B.F.F. Ouelette, K. Fichter,

- K.J.D. Ashbourne-Excoffon, C.W. Sensen, S. Scherer, S. Mott, M. Denis, D. Martindale, J. Frohlich, K. Morgan, B. Koop, S. Pimstone, J.J.P. Kastelein, J. Genest, M.R. Hayden, Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency, *Nat Genet.* 22 (1999) 336–345. <https://doi.org/10.1038/11905>.
- [31] L. Yvan-Charvet, F. Matsuura, N. Wang, M.J. Bamberger, T. Nguyen, F. Rinninger, X.-C. Jiang, C.L. Shear, A.R. Tall, Inhibition of Cholesteryl Ester Transfer Protein by Torcetrapib Modestly Increases Macrophage Cholesterol Efflux to HDL, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 27 (2007) 1132–1138. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.138347>.
- [32] M.J. van Dam, E. de Groot, S.M. Clee, G.K. Hovingh, R. Roelants, A. Brooks-Wilson, A.H. Zwinderman, A.J. Smit, A.H. Smelt, A.K. Groen, M.R. Hayden, J.J. Kastelein, Association between increased arterial-wall thickness and impairment in ABCA1-driven cholesterol efflux: an observational study, *The Lancet.* 359 (2002) 37–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07277-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07277-X).
- [33] C. Vedhachalam, P.T. Duong, M. Nickel, D. Nguyen, P. Dhanasekaran, H. Saito, G.H. Rothblat, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, Mechanism of ATP-binding Cassette Transporter A1-mediated Cellular Lipid Efflux to Apolipoprotein A-I and Formation of High Density Lipoprotein Particles, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 25123–25130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704590200>.
- [34] N. Fournier, G. Sayet, B. Védie, M. Nowak, F. Allaoui, A. Solgadi, E. Caudron, P. Chaminade, J.-F. Benoist, J.-L. Paul, Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages by reducing the cholesteryl ester mobilization from lipid droplets, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1862 (2017) 1079–1091. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.011>.
- [35] N. Fournier, S. Tardivel, J.-F. Benoist, B. Védie, D. Rousseau-Ralliard, M. Nowak, F. Allaoui, J.-L. Paul, Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux via a protein kinase A signaling pathway in primary human macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1861 (2016) 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.002>.
- [36] Tout savoir sur l'athérosclérose, Fondation pour la Recherche Médicale. (n.d.). <https://www.frm.org/recherches-maladies-cardiovasculaires/atherosclerose/focus-atherosclerose> (accessed November 10, 2021).
- [37] F. Delahaye, Athérome : épidémiologie et physiopathologie. Le malade polyathéromateux, *Les Items de la Revue du praticien.* 1 (2021) 31–34.
- [38] P.C. Norris, E.A. Dennis, Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109 (2012) 8517–8522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200189109>.
- [39] B. Rago, C. Fu, Development of a high-throughput ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry assay to profile 18 eicosanoids as exploratory biomarkers for atherosclerotic diseases, *Journal of Chromatography B.* 936 (2013) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.001>.
- [40] A.F. Galvão, T. Petta, N. Flamand, V.R. Bollala, C.L. Silva, L.R. Jarduli, K.C.R. Malmegrim, B.P. Simões, L.A.B. de Moraes, L.H. Faccioli, Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment, *Anal Bioanal Chem.* 408 (2016) 3613–3623. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9445-8>.
- [41] G. Chiesa, E. Monteggia, M. Marchesi, P. Lorenzon, M. Laucello, V. Lorusso, C. Di Mario, E. Karvouni, R.S. Newton, C.L. Bisgaier, G. Franceschini, C.R. Sirtori,



- Recombinant Apolipoprotein A-IMilano Infusion Into Rabbit Carotid Artery Rapidly Removes Lipid From Fatty Streaks, *Circulation Research*. 90 (2002) 974–980. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000018422.31717.EE>.
- [42] A.E. Bortnick, G.H. Rothblat, G. Stoudt, K.L. Hoppe, L.J. Royer, J. McNeish, O.L. Francone, The Correlation of ATP-binding Cassette 1 mRNA Levels with Cholesterol Efflux from Various Cell Lines, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 28634–28640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003407200>.
- [43] D. Caterina, n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease, *The New England Journal of Medicine*. (2011) 12.
- [44] C. Roach, S.E. Feller, J.A. Ward, S.R. Shaikh, M. Zerouga, W. Stillwell, Comparison of Cis and Trans Fatty Acid Containing Phosphatidylcholines on Membrane Properties, *Biochemistry*. 43 (2004) 6344–6351. <https://doi.org/10.1021/bi049917r>.
- [45] N. Fournier, N. Attia, D. Rousseau-Ralliard, B. Védie, F. Destailats, A. Grynberg, J.-L. Paul, Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1821 (2012) 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.10.005>.
- [46] O. Chambenoit, Y. Hamon, D. Marguet, H. Rigneault, M. Rosseneu, G. Chimini, Specific Docking of Apolipoprotein A-I at the Cell Surface Requires a Functional ABCA1 Transporter, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9955–9960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010265200>.
- [47] C. Vedhachalam, P.T. Duong, M. Nickel, D. Nguyen, P. Dhanasekaran, H. Saito, G.H. Rothblat, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, Mechanism of ATP-binding Cassette Transporter A1-mediated Cellular Lipid Efflux to Apolipoprotein A-I and Formation of High Density Lipoprotein Particles, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 25123–25130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704590200>.
- [48] G. Sayet, Analyses de macrophages : de la lipidomique à l'oxylipidomique, thesis, Paris Saclay, 2018. <http://www.theses.fr/2018SACL198> (accessed October 15, 2018).
- [49] N. Fournier, J.-F. Benoist, F. Allaoui, M. Nowak, H. Dakroub, B. Védie, J.-L. Paul, Contrasting effects of membrane enrichment with polyunsaturated fatty acids on phospholipid composition and cholesterol efflux from cholesterol-loaded J774 mouse or primary human macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. (2020) 158536. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158536>.
- [50] C. Leray, M. Record, *Les lipides dans le monde vivant : Introduction à la lipidomique*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 2010.
- [51] R. Martin-Venegas, O. Jáuregui, J.J. Moreno, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of eicosanoids and related compounds in cell models, *Journal of Chromatography B*. 964 (2014) 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.05.024>.
- [52] LIPID MAPS Lipidomics Gateway, (n.d.). <https://www.lipidmaps.org/> (accessed June 20, 2019).
- [53] M.W. Buczynski, D.S. Dumlao, E.A. Dennis, Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology1[S], *Journal of Lipid Research*. 50 (2009) 1015–1038. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900004-JLR200>.
- [54] R. Furman, J.V. Lee, P.H. Axelsen, Analysis of eicosanoid oxidation products in Alzheimer brain by LC-MS with uniformly <sup>13</sup>C-labeled internal standards, *Free Radical Biology and Medicine*. 118 (2018) 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.019>.
- [55] J.C. Neuman, M.D. Schaid, A.L. Brill, R.J. Fenske, C.R. Kibbe, D.A. Fontaine, S.M. Sdao, H.K. Brar, K.M. Connors, H.N. Wienkes, K.W. Eliceiri, M.J. Merrins, D.B. Davis, M.E. Kimple, Enriching islet phospholipids with eicosapentaenoic acid reduces

- prostaglandin E<sub>2</sub> signaling and enhances diabetic  $\beta$ -cell function, *Diabetes*. 66 (2017) 1572–1585. <https://doi.org/10.2337/db16-1362>.
- [56] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science*. 175 (1972) 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- [57] R.J. Deckelbaum, T.S. Worgall, T. Seo, n-3 Fatty acids and gene expression, *Am J Clin Nutr*. 83 (2006) 1520S-1525S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1520S>.
- [58] S.A. Kliewer, S.S. Sundseth, S.A. Jones, P.J. Brown, G.B. Wisely, C.S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T.M. Willson, J.M. Lenhard, J.M. Lehmann, Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ , *PNAS*. 94 (1997) 4318–4323. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4318>.
- [59] K. Schoonjans, B. Staels, J. Auwerx, Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression., *J. Lipid Res*. 37 (1996) 907–925.
- [60] A. Shevchenko, K. Simons, Lipidomics: coming to grips with lipid diversity, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11 (2010) 593–598. <https://doi.org/10.1038/nrm2934>.
- [61] G. Liebisch, J.A. Vizcaíno, H. Köfeler, M. Trötz Müller, W.J. Griffiths, G. Schmitz, F. Spener, M.J.O. Wakelam, Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry, *Journal of Lipid Research*. 54 (2013) 1523–1530. <https://doi.org/10.1194/jlr.M033506>.
- [62] M. Lange, Z. Ni, A. Criscuolo, M. Fedorova, Liquid Chromatography Techniques in Lipidomics Research, *Chromatographia*. 82 (2019) 77–100. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3656-4>.
- [63] M.C. Noverr, J.R. Erb-Downward, G.B. Huffnagle, Production of Eicosanoids and Other Oxylipins by Pathogenic Eukaryotic Microbes, *Clin Microbiol Rev*. 16 (2003) 517–533. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.517-533.2003>.
- [64] C. Leray, *Les lipides dans le monde vivant: introduction à la lipidomique*, Tec & Doc Lavoisier, 2010.
- [65] C. Ferreira-Vera, J.M. Mata-Granados, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, Automated method for targeting analysis of prostanooids in human serum by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry in selected reaction monitoring, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 2848–2855. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.049>.
- [66] G. Astarita, A.C. Kendall, E.A. Dennis, A. Nicolaou, Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1851 (2015) 456–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.11.012>.
- [67] H. Harizi, J.-B. Corcuff, N. Gualde, Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology, *Trends in Molecular Medicine*. 14 (2008) 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.08.005>.
- [68] Cipollone Francesco, Prontera Cesaria, Pini Barbara, Marini Matteo, Fazia Maria, De Cesare Domenico, Iezzi Annalisa, Uchino Sante, Boccoli Gianfranco, Saba Vittorio, Chiarelli Francesco, Cuccurullo Franco, Mezzetti Andrea, Overexpression of Functionally Coupled Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E Synthase in Symptomatic Atherosclerotic Plaques as a Basis of Prostaglandin E<sub>2</sub>-Dependent Plaque Instability, *Circulation*. 104 (2001) 921–927. <https://doi.org/10.1161/hc3401.093152>.
- [69] Hasan David, Hashimoto Tomoki, Kung David, Macdonald R. Loch, Winn H. Richard, Heistad Donald, Upregulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Microsomal Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase-1 (mPGES-1) in Wall of Ruptured Human Cerebral

- Aneurysms, Stroke. 43 (2012) 1964–1967.  
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.655829>.
- [70] L. Chen, R. Ackerman, M. Saleh, K.H. Gotlinger, M. Kessler, L.G. Mendelowitz, J.R. Falck, A.S. Arbab, A.G. Scicli, M.L. Schwartzman, J. Yang, A.M. Guo, 20-HETE Regulates the Angiogenic Functions of Human Endothelial Progenitor Cells and Contributes to Angiogenesis In Vivo, *J Pharmacol Exp Ther.* 348 (2014) 442–451.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.113.210120>.
- [71] T. Salim, J. Sand-Dejmek, A. Sjölander, The inflammatory mediator leukotriene D4 induces subcellular  $\beta$ -catenin translocation and migration of colon cancer cells, *Experimental Cell Research.* 321 (2014) 255–266.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.10.021>.
- [72] R.A. Colas, M. Shinohara, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue, *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 307 (2014) C39–C54.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00024.2014>.
- [73] R.A. Coleman, W.L. Smith, S. Narumiya, International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes., *Pharmacol Rev.* 46 (1994) 205–229.
- [74] M. Wang, A.M. Zukas, Y. Hui, E. Ricciotti, E. Pure, G.A. FitzGerald, Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 103 (2006) 14507–14512.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0606586103>.
- [75] A. Middleton, B. Middleton, Elevation of cyclic AMP by iloprost and prostaglandin E1 increases cholesterol efflux and the binding capacity for high-density lipoproteins in human fibroblasts, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.* 1391 (1998) 117–132. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00207-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00207-5).
- [76] W. Krone, A. Klass, H. Nägele, B. Behnke, H. Greten, Effects of prostaglandins on LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes., *J. Lipid Res.* 29 (1988) 1663–1669.
- [77] S. Zarini, M.A. Gijón, G. Folco, R.C. Murphy, Effect of Arachidonic Acid Recylation on Leukotriene Biosynthesis in Human Neutrophils Stimulated with Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor and Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 10134–10142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510783200>.
- [78] A. Muller, C. Bonne, Mécanismes d'action des leucotriènes, *Médecine/Sciences.* 5 (1989) 42–47.
- [79] E.A. Dennis, J. Cao, Y.-H. Hsu, V. Magrioti, G. Kokotos, Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention, *Chem Rev.* 111 (2011) 6130–6185.  
<https://doi.org/10.1021/cr200085w>.
- [80] A. Dupuy, P. Le Faouder, C. Vigor, C. Oger, J.-M. Galano, C. Dray, J.C.-Y. Lee, P. Valet, C. Gladine, T. Durand, J. Bertrand-Michel, Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanooids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC–MS/MS in various biological samples, *Analytica Chimica Acta.* 921 (2016) 46–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.024>.
- [81] K.M. Rund, A.I. Ostermann, L. Kutzner, J.-M. Galano, C. Oger, C. Vigor, S. Wecklein, N. Seiwert, T. Durand, N.H. Schebb, Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3- and n6-PUFAs, *Analytica Chimica Acta.* 1037 (2018) 63–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.002>.

- [82] L. Kortz, J. Dorow, S. Becker, J. Thiery, U. Ceglarek, Fast liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-mass spectrometry analysis of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma, *Journal of Chromatography B*. 927 (2013) 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.012>.
- [83] U. Jahn, J.-M. Galano, T. Durand, Beyond Prostaglandins—Chemistry and Biology of Cyclic Oxygenated Metabolites Formed by Free-Radical Pathways from Polyunsaturated Fatty Acids, *Angewandte Chemie International Edition*. 47 (2008) 5894–5955. <https://doi.org/10.1002/anie.200705122>.
- [84] D. Tsikas, A.A. Zoerner, Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: A historical retrospect and a discussion, *Journal of Chromatography B*. 964 (2014) 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.017>.
- [85] M.W. Buczynski, D.L. Stephens, R.C. Bowers-Gentry, A. Grkovich, R.A. Deems, E.A. Dennis, TLR-4 and Sustained Calcium Agonists Synergistically Produce Eicosanoids Independent of Protein Synthesis in RAW264.7 Cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 22834–22847. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701831200>.
- [86] P.C. Norris, E.A. Dennis, A lipidomic perspective on inflammatory macrophage eicosanoid signaling, *Advances in Biological Regulation*. 54 (2013) 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2013.09.009>.
- [87] Y.S. Chhonker, V. Bala, D.J. Murry, Quantification of eicosanoids and their metabolites in biological matrices: a review, *Bioanalysis*. 10 (2018) 2027–2046. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0173>.
- [88] P. Akarasereenont, J.A. Mitchell, Y.S. Bakhle, C. Thiemermann, J.R. Vane, Comparison of the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages, *European Journal of Pharmacology*. 273 (1995) 121–128. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)00680-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)00680-6).
- [89] P.C. Norris, D. Gosselin, D. Reichart, C.K. Glass, E.A. Dennis, Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammasome activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (2014) 12746–12751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404372111>.
- [90] V. Cardile, L. Lombardo, G. Granata, A. Perdicaro, M. Balazy, A. Santagati, Inhibition of iNOS and COX-2 in human whole blood ex vivo and monocyte-macrophage J774 cells by a new group of aminothiopyrimidone derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17 (2009) 1991–1996. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.029>.
- [91] V.B. O'Donnell, J. Rossjohn, M.J.O. Wakelam, Phospholipid signaling in innate immune cells, *Journal of Clinical Investigation*. 128 (2018) 2670–2679. <https://doi.org/10.1172/JCI97944>.
- [92] H. Cao, L. Xiao, G. Park, X. Wang, A.C. Azim, J.W. Christman, R.B. van Breemen, An improved LC–MS/MS method for the quantification of prostaglandins E2 and D2 production in biological fluids, *Analytical Biochemistry*. 372 (2008) 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.08.041>.
- [93] H. Darmani, J. Parton, J.L. Harwood, S.K. Jackson, Interferon- $\gamma$  and polyunsaturated fatty acids increase the binding of lipopolysaccharide to macrophages, *International Journal of Experimental Pathology*. 75 (1994) 363–368.
- [94] L. Pang, J.R.S. Hout, Induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in endotoxin-activated J774 macrophages is differentially regulated by indomethacin: Enhanced cyclooxygenase-2 protein expression but reduction of inducible nitric oxide synthase, *European Journal of Pharmacology*. 317 (1996) 151–155. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00703-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00703-0).
- [95] F. D'Acquisto, T. Iuvone, L. Rombolà, L. Sautebin, M.D. Rosa, R. Carnuccio, Involvement of NF- $\kappa$ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-

- stimulated J774 macrophages, *FEBS Letters*. 418 (1997) 175–178. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01377-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01377-X).
- [96] L. Pang, J.R.S. Hoult, Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages, *Biochemical Pharmacology*. 53 (1997) 493–500. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(96\)00737-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(96)00737-X).
- [97] T.A. Swierkosz, J.A. Mitchell, T.D. Warner, R.M. Botting, J.R. Vane, Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids, *British Journal of Pharmacology*. 114 (1995) 1335–1342. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13353.x>.
- [98] M. Wang, C. Wang, R.H. Han, X. Han, Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine, *Progress in Lipid Research*. 61 (2016) 83–108. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.002>.
- [99] J. Wang, C. Wang, X. Han, Tutorial on lipidomics, *Analytica Chimica Acta*. 1061 (2019) 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.043>.
- [100] H.-C. Lee, T. Yokomizo, Applications of mass spectrometry-based targeted and non-targeted lipidomics, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 504 (2018) 576–581. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.081>.
- [101] C.N. Serhan, Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 8 (2005) 115.
- [102] N. Bernoud-Hubac, M. Lagarde, M. Guichardant, Lipidomique et santé humaine, *Biochem J*. 3 (1982) 771–6.
- [103] K. Yang, X. Han, Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences, *Trends in Biochemical Sciences*. 41 (2016) 954–969. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.010>.
- [104] S. Kohno, A.L. Keenan, J.M. Ntambi, M. Miyazaki, Lipidomic insight into cardiovascular diseases, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 504 (2018) 590–595. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.106>.
- [105] C. Peres-Buzalaf, L. de Paula, F.G. Frantz, E.M. Soares, A.I. Medeiros, M. Peters-Golden, C.L. Silva, L.H. Faccioli, Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 85 (2011) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.024>.
- [106] A.I. Medeiros, C.L. Silva, A. Malheiro, C.M.L. Maffei, L.H. Faccioli, Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the  $\beta$ -glucan present in their cell wall, *British Journal of Pharmacology*. 128 (1999) 1529–1537. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702912>.
- [107] D.S. Dumlao, M.W. Buczynski, P.C. Norris, R. Harkewicz, E.A. Dennis, High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acylethanolamines, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1811 (2011) 724–736. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.005>.
- [108] M. Puppolo, D. Varma, S.A. Jansen, A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue, *Journal of Chromatography B*. 964 (2014) 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.007>.
- [109] D. Tsikas, J. Fauler, R.D. Velásquez, F.-M. Gutzki, J.C. Frölich, Catalytic Hydrogenation of Leukotriene B<sub>4</sub> Enhances Sensitivity and Specificity of Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Techniques and Enables Simultaneous Analysis with Cysteinyl Leukotrienes in Biological Fluids, *Analytical Biochemistry*. 236 (1996) 175–178. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0149>.

- [110] D. Tsikas, E. Schwedhelm, M.-T. Suchy, J. Niemann, F.-M. Gutzki, V.J. Erpenbeck, J.M. Hohlfeld, A. Surdacki, J.C. Frolich, Divergence in urinary 8-iso-PGF2a (iPF2a-III, 15-F2t-IsoP) levels from gas chromatography–tandem mass spectrometry quantification after thin-layer chromatography and immunoaffinity column chromatography reveals heterogeneity of 8-iso-PGF2a Possible methodological, mechanistic and clinical implications, *J. Chromatogr. B.* (2003) 19.
- [111] H. Schweer, J. Kammer, W. Seyberth, SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PROSTANOIDS IN PLASMA BY GAS CHROMATOGRAPHY-NEGATIVE-ION CHEMICAL-IONIZATION MASS SPECTROMETRY, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 338 (1985) 273–280. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0378-4347\(85\)80098-0](https://doi.org/doi.org/10.1016/0378-4347(85)80098-0).
- [112] D. Tsikas, Quantitative analysis of biomarkers, drugs and toxins in biological samples by immunoaffinity chromatography coupled to mass spectrometry or tandem mass spectrometry: A focused review of recent applications, *Journal of Chromatography B.* 878 (2010) 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.008>.
- [113] R.C. Murphy, R.M. Barkley, K. Zemski Berry, J. Hankin, K. Harrison, C. Johnson, J. Krank, A. McAnoy, C. Uhlson, S. Zarini, Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids, *Analytical Biochemistry.* 346 (2005) 1–42. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.042>.
- [114] R.C. Murphy, S. Hammarstrom, B. Samuelsson, Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells., *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 76 (1979) 4275–4279. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4275>.
- [115] M. VanRollins, V.A. VanderNoot, Simultaneous resolution of underivatized regioisomers and stereoisomers of arachidonate epoxides by capillary electrophoresis, *Analytical Biochemistry.* (2003) 11.
- [116] L. Kortz, J. Dorow, U. Ceglarek, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of eicosanoids and related lipids in human biological matrices: A review, *Journal of Chromatography B.* 964 (2014) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.046>.
- [117] W. Lin, M.-Q. Huang, X. Xue, K. Bertelsen, G. Chen, H. Zhao, Z. (John) Lin, A. Fourie, J. de Jong, N. Weng, A highly sensitive and selective method for the determination of leukotriene B4 (LTB4) in ex vivo stimulated human plasma by ultra fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B.* 925 (2013) 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.02.038>.
- [118] P. Araujo, Z. Mengesha, E. Lucena, B. Grung, Development and validation of an extraction method for the determination of pro-inflammatory eicosanoids in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A.* 1353 (2014) 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.082>.
- [119] T. Petta, L.A.B. Moraes, L.H. Faccioli, Versatility of tandem mass spectrometry for focused analysis of oxylipids: Focused analysis of oxylipids, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 879–890. <https://doi.org/10.1002/jms.3595>.
- [120] D. Tsikas, Quantitative analysis of eicosanoids in biological samples by LC–MS/MS: Mission accomplished?, *Journal of Chromatography B.* 1012–1013 (2016) 211–214. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.04.018>.
- [121] A. Aghazadeh-Habashi, W. Asghar, F. Jamali, Simultaneous determination of selected eicosanoids by reversed-phase HPLC method using fluorescence detection and application to rat and human plasma, and rat heart and kidney samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 110 (2015) 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.041>.

- [122] P.G. Morris, X.K. Zhou, G.L. Milne, D. Goldstein, L.C. Hawks, C.T. Dang, S. Modi, M.N. Fornier, C.A. Hudis, A.J. Dannenberg, Increased Levels of Urinary PGE-M, a Biomarker of Inflammation, Occur in Association with Obesity, Aging, and Lung Metastases in Patients with Breast Cancer, *Cancer Prevention Research*. 6 (2013) 428–436. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0431>.
- [123] Y. Issan, E. Hochhauser, A. Guo, K.H. Gotlinger, R. Kornowski, D. Leshem-Lev, E. Lev, E. Porat, E. Snir, C.I. Thompson, N.G. Abraham, M. Laniado-Schwartzman, Elevated level of pro-inflammatory eicosanoids and EPC dysfunction in diabetic patients with cardiac ischemia, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 100–101 (2013) 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.12.002>.
- [124] A. Margalit, K.L. Duffin, P.C. Isakson, Rapid Quantitation of a Large Scope of Eicosanoids in Two Models of Inflammation: Development of an Electrospray and Tandem Mass Spectrometry Method and Application to Biological Studies, *Analytical Biochemistry*. 235 (1996) 73–81. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0093>.
- [125] T. Oe, B.L. Ackermann, K. Inoue, M.J. Berna, C.O. Garner, V. Gelfanova, R.A. Dean, E.R. Siemers, D.M. Holtzman, M.R. Farlow, I.A. Blair, Quantitative analysis of amyloid  $\beta$  peptides in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients by immunoaffinity purification and stable isotope dilution liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20 (2006) 3723–3735. <https://doi.org/10.1002/rcm.2787>.
- [126] J. Folch, M. Lees, G.S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry*. 226 (1957) 497–509.
- [127] M. Basselin, M.A. Fox, L. Chang, J.M. Bell, D. Greenstein, M. Chen, D.L. Murphy, S.I. Rapoport, Imaging Elevated Brain Arachidonic Acid Signaling in Unanesthetized Serotonin Transporter (5-HTT)-Deficient Mice, *Neuropsychopharmacol*. 34 (2009) 1695–1709. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.227>.
- [128] M.Y. Golovko, E.J. Murphy, An improved LC-MS/MS procedure for brain prostanoid analysis using brain fixation with head-focused microwave irradiation and liquid-liquid extraction, *Journal of Lipid Research*. 49 (2008) 893–902. <https://doi.org/10.1194/jlr.D700030-JLR200>.
- [129] S.C. Amruthesh, J.R. Falck, E.F. Ellis, Brain Synthesis and Cerebrovascular Action of Epoxygenase Metabolites of Arachidonic Acid, *Journal of Neurochemistry*. 58 (1992) 503–510. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09749.x>.
- [130] K. Sterz, G. Scherer, J. Ecker, A simple and robust UPLC-SRM/MS method to quantify urinary eicosanoids, *J. Lipid Res*. 53 (2012) 1026–1036. <https://doi.org/10.1194/jlr.D023739>.
- [131] W.S. Powell, Extraction of Eicosanoids from Biological Fluids, Cells, and Tissues, in: *Eicosanoid Protocols*, Humana Press, New Jersey, 1999: pp. 11–24. <https://doi.org/10.1385/1-59259-263-5:11>.
- [132] K.R. Maddipati, S.-L. Zhou, Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 94 (2011) 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.01.003>.
- [133] R. Deems, M.W. Buczynski, R. Bowers-Gentry, R. Harkewicz, E.A. Dennis, Detection and Quantitation of Eicosanoids via High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2007: pp. 59–82. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)32003-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)32003-X).
- [134] T.M. Miller, S.M. Poloyac, K.B. Anderson, B.L. Waddell, E. Messamore, J.K. Yao, A rapid UPLC-MS/MS assay for eicosanoids in human plasma: Application to evaluate niacin responsivity, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 136 (2018) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.01.003>.

- [135] F. Chapuis, V. Pichon, M.-C. Hennion, Méthode de préconcentration par extraction en phase solide : principe et application aux industries environnementales et pétrolières, *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP*. 60 (2005) 899–912. <https://doi.org/10.2516/ogst:2005063>.
- [136] H. Yue, S.A. Jansen, K.I. Strauss, M.R. Borenstein, M.F. Barbe, L.J. Rossi, E. Murphy, A liquid chromatography/mass spectrometric method for simultaneous analysis of arachidonic acid and its endogenous eicosanoid metabolites prostaglandins, dihydroxyeicosatrienoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids, and epoxyeicosatrienoic acids in rat brain tissue, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 43 (2007) 1122–1134. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.10.009>.
- [137] X. Zhang, N. Yang, D. Ai, Y. Zhu, Systematic Metabolomic Analysis of Eicosanoids after Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation by a Highly Specific Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry–Based Method, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 1843–1853. <https://doi.org/10.1021/pr501200u>.
- [138] V.B. O'Donnell, B. Maskrey, G.W. Taylor, Eicosanoids: Generation and Detection in Mammalian Cells, in: B. Larijani, R. Woscholski, C.A. Rosser (Eds.), *Lipid Signaling Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2009: pp. 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-115-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-115-8_1).
- [139] A.I. Ostermann, E. Koch, K.M. Rund, L. Kutzner, M. Mainka, N.H. Schebb, Targeting esterified oxylipins by LC–MS - Effect of sample preparation on oxylipin pattern, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 146 (2020) 106384. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106384>.
- [140] M. Masoodi, A. Nicolaou, Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20 (2006) 3023–3029. <https://doi.org/10.1002/rcm.2697>.
- [141] J.T. English, P.C. Norris, R.R. Hodges, D.A. Dartt, C.N. Serhan, Identification and Profiling of Specialized Pro-Resolving Mediators in Human Tears by Lipid Mediator Metabolomics, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 117 (2017) 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.01.004>.
- [142] L.A. Moraes, R.M. Giner, M.J. Paul-Clark, M. Perretti, D. Perrett, An isocratic HPLC method for the quantitation of eicosanoids in human platelets, *Biomedical Chromatography*. 18 (2004) 64–68. <https://doi.org/10.1002/bmc.349>.
- [143] W.S. Powell, High Pressure Liquid Chromatography of Eicosanoids, in: W.E.M. Lands (Ed.), *Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism*, Springer US, Boston, MA, 1985: pp. 375–403. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2597-0\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2597-0_22).
- [144] B.H. Maskrey, A. Bermúdez-Fajardo, A.H. Morgan, E. Stewart-Jones, V. Dioszeghy, G.W. Taylor, P.R.S. Baker, B. Coles, M.J. Coffey, H. Kühn, V.B. O'Donnell, Activated Platelets and Monocytes Generate Four Hydroxyphosphatidylethanolamines via Lipoxygenase \*, *Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 20151–20163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611776200>.
- [145] M. Masoodi, M. Eiden, A. Koulman, D. Spaner, D.A. Volmer, Comprehensive Lipidomics Analysis of Bioactive Lipids in Complex Regulatory Networks, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8176–8185. <https://doi.org/10.1021/ac1015563>.
- [146] K.A. Massey, A. Nicolaou, Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids, *Free Radical Biology and Medicine*. 59 (2013) 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.565>.
- [147] J.S.B. Shaik, T.M. Miller, S.H. Graham, M.D. Manole, S.M. Poloyac, Rapid and simultaneous quantitation of prostanoids by UPLC–MS/MS in rat brain, *Journal of*



- Chromatography B. 945–946 (2014) 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.041>.
- [148] C.A. Sorgi, A.P.F. Peti, T. Petta, A.F.G. Meirelles, C. Fontanari, L.A.B. de Moraes, L.H. Faccioli, Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays, *Sci Data*. 5 (2018) 180167. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.167>.
- [149] G. Chen, Q. Zhang, Comprehensive analysis of oxylipins in human plasma using reversed-phase liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with heatmap-assisted selection of transitions, *Anal Bioanal Chem*. 411 (2019) 367–385. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1446-3>.
- [150] D. Tsikas, Application of gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans1Dedicated to Prof. Jürgen C. Frölich for his 60th anniversary.1, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 717 (1998) 201–245. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00210-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00210-2).
- [151] N. Aldai, B.E. Murray, A.I. Nájera, D.J. Troy, K. Osoro, Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85 (2005) 1073–1083. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2110>.
- [152] X. Han, K. Yang, H. Cheng, K.N. Fikes, R.W. Gross, Shotgun lipidomics of phosphoethanolamine-containing lipids in biological samples after one-step in situ derivatization, *Journal of Lipid Research*. 46 (2005) 1548–1560. <https://doi.org/10.1194/jlr.D500007-JLR200>.
- [153] M. Holčapek, E. Cífková, B. Červená, M. Lísa, J. Vostálová, J. Galuszka, Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1377 (2015) 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.023>.
- [154] H. Nie, R. Liu, Y. Yang, Y. Bai, Y. Guan, D. Qian, T. Wang, H. Liu, Lipid profiling of rat peritoneal surface layers by online normal- and reversed-phase 2D LC QToF-MS, *J. Lipid Res*. 51 (2010) 2833–2844. <https://doi.org/10.1194/jlr.D007567>.
- [155] C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Journal of Chromatography A*. 125 (1976) 129–156. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)93816-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)93816-0).
- [156] Z. Wang, M. Fingas, Rapid separation of non-ionic surfactants of polyethoxylated octylphenol and determination of ethylene oxide oligomer distribution by C1 column reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 637 (1993) 145–156. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83207-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83207-9).
- [157] C.M. Bell, L.C. Sander, S.A. Wise, Temperature dependence of carotenoids on C18, C30 and C34 bonded stationary phases, *Journal of Chromatography A*. 757 (1997) 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00664-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00664-4).
- [158] E.M. Borges, How to select equivalent and complimentary reversed phase liquid chromatography columns from column characterization databases, *Analytica Chimica Acta*. 807 (2014) 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.010>.
- [159] J. Nawrocki, The silanol group and its role in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 779 (1997) 29–71. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00479-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00479-2).
- [160] J. Köhler, J.J. Kirkland, Improved silica-based column packings for high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 385 (1987) 125–150. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94628-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94628-X).

- [161] E.M. Borges, Silica, Hybrid Silica, Hydride Silica and Non-Silica Stationary Phases for Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science*. 53 (2014) 580–597. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu090>.
- [162] J. Nawrocki, B. Buszewski, Influence of silica surface chemistry and structure on the properties, structure and coverage of alkyl-bonded phases for high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 449 (1988) 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94364-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94364-4).
- [163] D.V. McCalley, R.G. Brereton, High-performance liquid chromatography of basic compounds: Problems, possible solutions and tests of reversed-phase columns, *Journal of Chromatography A*. 828 (1998) 407–420. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00590-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00590-1).
- [164] J. Nawrocki, Silica surface controversies, strong adsorption sites, their blockage and removal. Part II, *Chromatographia*. 31 (1991) 193–205. <https://doi.org/10.1007/BF02274571>.
- [165] A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, U.D. Neue, Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns, *Journal of Chromatography A*. 986 (2003) 33–44. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01899-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01899-X).
- [166] J.J. Kirkland, J.W. Henderson, J.D. Martosella, B.A. Bidlingmeyer, J. Vasta-Russel, J.B. Adams Jr, A Highly Stable Alkyl–Amide Silica-Based Column Packing for Silica-Based Column Packing for Reversed-Phase HPLC of Polar Reversed-Phase HPLC of Polar and Ionizable Compounds and Ionizable Compound, *LCGC North América*. 17 (1999) 634.
- [167] M. GAMAL, E. Shafei, *Silica surface chemical properties*, New York: Marcel Dekker, Inc, 2000.
- [168] J.J. Kirkland, Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC, *Journal of Chromatography A*. 1060 (2004) 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.057>.
- [169] S.A. Wise, L.C. Sander, Factors affecting the reversed-phase liquid chromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbon isomers, *Journal of High Resolution Chromatography*. 8 (1985) 248–255. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240080506>.
- [170] L.C. Sander, M. Pursch, S.A. Wise, Shape Selectivity for Constrained Solutes in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Anal. Chem*. 71 (1999) 4821–4830. <https://doi.org/10.1021/ac9908187>.
- [171] A. Criscuolo, M. Zeller, K. Cook, G. Angelidou, M. Fedorova, Rational selection of reverse phase columns for high throughput LC–MS lipidomics, *Chemistry and Physics of Lipids*. 221 (2019) 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.006>.
- [172] G.P. O’Sullivan, N.M. Scully, J.D. Glennon, Polar-Embedded and Polar-Endcapped Stationary Phases for LC, *Analytical Letters*. 43 (2010) 1609–1629. <https://doi.org/10.1080/00032711003653973>.
- [173] T. Czajkowska, M. Jaroniec, Selectivity of alkylamide bonded-phases with respect to organic acids under reversed-phase conditions, *Journal of Chromatography A*. 762 (1997) 147–158. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00966-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00966-1).
- [174] C. Yang, T. Ikegami, T. Hara, N. Tanaka, Improved endcapping method of monolithic silica columns, *Journal of Chromatography A*. 1130 (2006) 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.010>.
- [175] J.J. Pesek, M.T. Matyska, R.J. Yu, Synthesis and characterization of endcapped C18 stationary phases using a silica hydride intermediate, *Journal of Chromatography A*. 947 (2002) 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00014-6).
- [176] J.C. Giddings, H. Eyring, A Molecular Dynamic Theory of Chromatography, *J. Phys. Chem*. 59 (1955) 416–421. <https://doi.org/10.1021/j150527a009>.

- [177] J.J. van Deemter, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science*. 50 (1956) 271–289. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(96\)81812-4](https://doi.org/10.1016/0009-2509(96)81812-4).
- [178] N. Tanaka, D.V. McCalley, Core–Shell, Ultrasmall Particles, Monoliths, and Other Support Materials in High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 88 (2016) 279–298. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04093>.
- [179] Szabolcs Fekete, G. Davy, M.W. Dong, Superficially Porous Particles: Perspectives, Practices, and Trends, *LCGC North América*. 32 (2014) 420–433.
- [180] F. Gritti, G. Guiochon, Facts and legends about columns packed with sub-3- $\mu\text{m}$  core-shell particles, *LC GC N. Am.* 30 (2012) 586–595.
- [181] J.C. Giddings, Effect of membranes and other porous networks on the equilibrium and rate constants of macromolecular reactions, *J. Phys. Chem.* 74 (1970) 1368–1370. <https://doi.org/10.1021/j100701a037>.
- [182] F. Gritti, G. Guiochon, Rapid development of core–shell column technology: Accurate measurements of the intrinsic column efficiency of narrow-bore columns packed with 4.6 down to 1.3 $\mu\text{m}$  superficially porous particles, *Journal of Chromatography A*. 1333 (2014) 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.061>.
- [183] F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer resistance in narrow-bore columns packed with 1.7 $\mu\text{m}$  particles in very high pressure liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 5069–5083. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.059>.
- [184] F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer mechanism in liquid chromatography columns packed with shell particles: Would there be an optimum shell structure?, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 8167–8180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.075>.
- [185] F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency, *Journal of Chromatography A*. 1221 (2012) 2–40. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.058>.
- [186] F. Gritti, G. Guiochon, The rationale for the optimum efficiency of columns packed with new 1.9 $\mu\text{m}$  fully porous Titan-C18 particles—A detailed investigation of the intra-particle diffusivity, *Journal of Chromatography A*. 1355 (2014) 164–178. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.076>.
- [187] F. Gritti, G. Guiochon, The quantitative impact of the mesopore size on the mass transfer mechanism of the new 1.9 $\mu\text{m}$  fully porous Titan-C18 particles. I: Analysis of small molecules, *Journal of Chromatography A*. 1384 (2015) 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.047>.
- [188] F. Gritti, G. Guiochon, The quantitative impact of the mesopore size on the mass transfer mechanism of the new 1.9 $\mu\text{m}$  fully porous Titan-C18 particles II – Analysis of biomolecules, *Journal of Chromatography A*. 1392 (2015) 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.075>.
- [189] V.K. Langsi, B.A. Ashu-Arrah, J.D. Glennon, Sub-2- $\mu\text{m}$  seeded growth mesoporous thin shell particles for high-performance liquid chromatography: Synthesis, functionalisation and characterisation, *Journal of Chromatography A*. 1402 (2015) 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.034>.
- [190] J.G. Dorsey, K.A. Dill, The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography, *Chemical Reviews*. 89 (1989) 331–346. <https://doi.org/10.1021/cr00092a005>.
- [191] K.A. Dill, The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography, *The Journal of Physical Chemistry*. 91 (1987) 1980–1988. <https://doi.org/10.1021/j100291a060>.

- [192] A. Hazotte, La micro chromatographie liquide à haute température pour l'analyse rapide et hautement discriminante des lipides d'intérêt biologique, thesis, Paris 11, 2007. <http://www.theses.fr/2007PA114818> (accessed July 8, 2019).
- [193] F. Rouessac, A. Rouessac, D. Cruché, G. Ourisson, Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6e édition, Dunod, Paris, 2004.
- [194] P.J. Schoenmakers, Optimization of Chromatographic Selectivity: A Guide to Method Development, Elsevier, 1986.
- [195] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, Chromatographies en phases liquide et supercritique, Masson Paris etc, 1991.
- [196] K. Valkó, L.R. Snyder, J.L. Glajch, Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition, *Journal of Chromatography A*. 656 (1993) 501–520. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80816-Q](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80816-Q).
- [197] HPLC Columns - HPLC column selectivity measurements of more than 600 reversed phase columns from over 30 manufacturers, (n.d.). <http://www.hplccolumns.org/index.php> (accessed September 30, 2019).
- [198] P. Žuvela, M. Skoczylas, J. Jay Liu, T. Bączek, R. Kaliszan, M.W. Wong, B. Buszewski, Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Chem. Rev.* 119 (2019) 3674–3729. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246>.
- [199] E. Lesellier, C. West, Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification, *Journal of Chromatography A*. 1158 (2007) 329–360. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.122>.
- [200] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic Characterization of Silica C18 Packing Materials. Correlation between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase, *Journal of Chromatographic Science*. 27 (1989) 721–728. <https://doi.org/10.1093/chromsci/27.12.721>.
- [201] J. Layne, Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases, *Journal of Chromatography A*. 957 (2002) 149–164. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00193-0).
- [202] J. Pellett, P. Lukulay, Y. Mao, W. Bowen, R. Reed, M. Ma, R.C. Munger, J.W. Dolan, L. Wrisley, K. Medwid, N.P. Toltl, C.C. Chan, M. Skibic, K. Biswas, K.A. Wells, L.R. Snyder, “Orthogonal” separations for reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1101 (2006) 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.080>.
- [203] L.R. Snyder, P.W. Carr, J.W. Dolan, R.E. Majors, New horizons in reversed-phase chromatography selectivity, *LC-GC North America*. 28 (2010) 418–426.
- [204] N.S. Wilson, J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: VI. Columns with embedded or end-capping polar groups, *Journal of Chromatography A*. 1026 (2004) 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.041>.
- [205] C.F. Poole, S.K. Poole, Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model, *Journal of Chromatography A*. 965 (2002) 263–299. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01361-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01361-9).
- [206] L. Snyder, J. Dolan, P. Carr, The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity, *Journal of Chromatography A*. 1060 (2004) 77–116. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01480-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01480-3).
- [207] N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Wolcott, P.W. Carr, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: I. A general quantitative

- relationship, *Journal of Chromatography A*. 961 (2002) 171–193. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00659-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00659-3).
- [208] J. Calvin. Giddings, Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1027–1028. <https://doi.org/10.1021/ac60252a025>.
- [209] C.G. Horvath, S.R. Lipsky, Peak capacity in chromatography, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1893–1893. <https://doi.org/10.1021/ac50157a075>.
- [210] U.D. Neue, Theory of peak capacity in gradient elution, *Journal of Chromatography A*. 1079 (2005) 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.008>.
- [211] A. Peeters, L. Buydens, D.L. Massart, P.J. Schoenmakers, An expert system for the selection of criteria for selectivity optimization in high-pressure liquid chromatography, *Chromatographia*. 26 (1988) 101–109. <https://doi.org/10.1007/BF02268132>.
- [212] P.F. Vanbel, B.L. Tilquin, P.J. Schoenmakers, Criteria for optimizing the separation of target analytes in complex chromatograms, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 35 (1996) 67–86. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(96\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(96)00046-9).
- [213] S. Rinne, C. Ramstad Kleiveland, M. Kasseem, T. Lea, E. Lundanes, T. Greibrokk, Fast and simple online sample preparation coupled with capillary LC-MS/MS for determination of prostaglandins in cell culture supernatants, *Journal of Separation Science*. 30 (2007) 1860–1869. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700064>.
- [214] R. Berkecz, M. LÍsa, M. Holčápek, Analysis of oxylipins in human plasma: Comparison of ultrahigh-performance liquid chromatography and ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1511 (2017) 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.070>.
- [215] S.J.K.A. Ubhayasekera, S. R. Acharya, J. Bergquist, A novel, fast and sensitive supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry (SFC-MS/MS) method for analysis of arachidonic acid metabolites, *Analyst*. 143 (2018) 3661–3669. <https://doi.org/10.1039/C8AN00788H>.
- [216] R.G. Ramos, D. Libong, M. Rakotomanga, K. Gaudin, P.M. Loiseau, P. Chaminade, Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of Leishmania membrane phospholipids, *Journal of Chromatography A*. 1209 (2008) 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.080>.
- [217] S. Abreu, A. Solgadi, P. Chaminade, Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques, *Journal of Chromatography A*. 1514 (2017) 54–71. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.063>.
- [218] J.M. Charlesworth, Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography, *Analytical Chemistry*. 50 (1978) 1414–1420. <https://doi.org/10.1021/ac50033a011>.
- [219] K. Takahashi, S. Kinugasa, M. Senda, K. Kimizuka, K. Fukushima, T. Matsumoto, Y. Shibata, J. Christensen, Quantitative comparison of a corona-charged aerosol detector and an evaporative light-scattering detector for the analysis of a synthetic polymer by supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1193 (2008) 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.012>.
- [220] R.W. Dixon, D.S. Peterson, Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2930–2937. <https://doi.org/10.1021/ac011208l>.
- [221] S. NUKIYAMA, Experiments on the atomization of liquids in an air stream, report 3, on the droplet-size distribution in a atomized jet, *Trans. Soc. Mech. Eng. Japan*. 5 (1939) 62–67.

- [222] Spectrométrie — acadpharm, (n.d.). <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Spectrom%C3%A9trie> (accessed February 23, 2022).
- [223] B.L. Peterson, B.S. Cummings, A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples, *Biomedical Chromatography*. 20 (2006) 227–243. <https://doi.org/10.1002/bmc.563>.
- [224] C. Mesaros, S.H. Lee, I.A. Blair, Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*. 877 (2009) 2736–2745. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.011>.
- [225] I. Dzidic, D.I. Carroll, R.N. Stillwell, E.C. Horning, Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Formation of phenoxide ions from chlorinated aromatic compounds, ACS Publications. (2002). <https://doi.org/10.1021/ac60358a077>.
- [226] G. Singh, A. Gutierrez, K. Xu, I.A. Blair, Liquid Chromatography/Electron Capture Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry: Analysis of Pentafluorobenzyl Derivatives of Biomolecules and Drugs in the Attomole Range, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3007–3013. <https://doi.org/10.1021/ac000374a>.
- [227] S.L. Gelhaus, A.C. Mesaros, I.A. Blair, Cellular Lipid Extraction for Targeted Stable Isotope Dilution Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. (2011) e3399. <https://doi.org/10.3791/3399>.
- [228] J. Bylund, J. Ericsson, E.H. Oliw, Analysis of Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic and Linoleic Acids by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry with Ion Trap MS2, *Analytical Biochemistry*. 265 (1998) 55–68. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2897>.
- [229] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Science*. 246 (1989) 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>.
- [230] P. Kebarle, M. Peschke, On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions, *Analytica Chimica Acta*. 406 (2000) 11–35. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00598-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00598-X).
- [231] S. Giroud, A.L. Evans, I. Chery, F. Bertile, G. Tascher, J. Bertrand-Michel, G. Gauquelin-Koch, J.M. Arnemo, J.E. Swenson, E. Lefai, S. Blanc, C. Simon, Seasonal changes in eicosanoid metabolism in the brown bear, *Sci Nat*. 105 (2018) 58. <https://doi.org/10.1007/s00114-018-1583-8>.
- [232] D.J. Kiemle, R.M. Silverstein, F.X. Webster, *Identification spectrométrique de composés organiques - 3ème édition*, De Boeck Supérieur, 2016.
- [233] W. Paul, H. Steinwedel, Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld, *Zeitschrift Für Naturforschung A*. 8 (1953) 448–450. <https://doi.org/10.1515/zna-1953-0710>.
- [234] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 2007.
- [235] R.A. Colas, M. Shinohara, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 307 (2014) C39–C54. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00024.2014>.
- [236] W.C. Wiley, I.H. McLaren, Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution, *Review of Scientific Instruments*. 26 (1955) 1150–1157. <https://doi.org/10.1063/1.1715212>.

- [237] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski, Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*. 19 (2000) 65–107. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(2000\)19:2<65::AID-MAS1>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(2000)19:2<65::AID-MAS1>3.0.CO;2-E).
- [238] M. Li, B. Feng, Y. Liang, W. Zhang, Y. Bai, W. Tang, T. Wang, H. Liu, Lipid profiling of human plasma from peritoneal dialysis patients using an improved 2D (NP/RP) LC-QToF MS method, *Anal Bioanal Chem*. 405 (2013) 6629–6638. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7109-5>.
- [239] K. Sandra, A. dos S. Pereira, G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 4087–4099. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.039>.
- [240] Z.-X. Yuan, S.I. Rapoport, S.J. Soldin, A.T. Remaley, A.Y. Taha, M. Kellom, J. Gu, M. Sampson, C.E. Ramsden, Identification and profiling of targeted oxidized linoleic acid metabolites in rat plasma by quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*. 27 (2013) 422–432. <https://doi.org/10.1002/bmc.2809>.
- [241] A. Makarov, Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis, *Anal. Chem*. 72 (2000) 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>.
- [242] R.A. Zubarev, A. Makarov, Orbitrap Mass Spectrometry, *Anal. Chem*. 85 (2013) 5288–5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>.
- [243] J.V. Olsen, J.C. Schwartz, J. Griep-Raming, M.L. Nielsen, E. Damoc, E. Denisov, O. Lange, P. Remes, D. Taylor, M. Splendore, E.R. Wouters, M. Senko, A. Makarov, M. Mann, S. Horning, A Dual Pressure Linear Ion Trap Orbitrap Instrument with Very High Sequencing Speed \*, *Molecular & Cellular Proteomics*. 8 (2009) 2759–2769. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900375-MCP200>.
- [244] A. Kalli, G.T. Smith, M.J. Sweredoski, S. Hess, Evaluation and Optimization of Mass Spectrometric Settings during Data-dependent Acquisition Mode: Focus on LTQ-Orbitrap Mass Analyzers, *J. Proteome Res*. 12 (2013) 3071–3086. <https://doi.org/10.1021/pr3011588>.
- [245] S. Eliuk, A. Makarov, Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation, *Annual Rev. Anal. Chem*. 8 (2015) 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325>.
- [246] J. Larose, P. Julien, J.-F. Bilodeau, Analysis of F<sub>2</sub>-isoprostanes in plasma of pregnant women by HPLC-MS/MS using a column packed with core-shell particles, *J. Lipid Res*. 54 (2013) 1505–1511. <https://doi.org/10.1194/jlr.D034553>.
- [247] A.J. Blewett, D. Varma, T. Gilles, J.R. Libonati, S.A. Jansen, Development and validation of a high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry method for the simultaneous determination of 23 eicosanoids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 46 (2008) 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.047>.
- [248] J. Guo, T. Huan, Evaluation of significant features discovered from different data acquisition modes in mass spectrometry-based untargeted metabolomics, *Analytica Chimica Acta*. 1137 (2020) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.065>.
- [249] F. Fenaille, P. Barbier Saint-Hilaire, K. Rousseau, C. Junot, Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand?, *Journal of Chromatography A*. 1526 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.043>.
- [250] G. Mullard, J.W. Allwood, R. Weber, M. Brown, P. Begley, K.A. Hollywood, M. Jones, R.D. Unwin, P.N. Bishop, G.J.S. Cooper, W.B. Dunn, A new strategy for MS/MS data acquisition applying multiple data dependent experiments on Orbitrap mass

- spectrometers in non-targeted metabolomic applications, *Metabolomics*. 11 (2015) 1068–1080. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0763-6>.
- [251] P. Barbier Saint Hilaire, K. Rousseau, A. Seyer, S. Dechaumet, A. Damont, C. Junot, F. Fenaille, Comparative Evaluation of Data Dependent and Data Independent Acquisition Workflows Implemented on an Orbitrap Fusion for Untargeted Metabolomics, *Metabolites*. 10 (2020) 158. <https://doi.org/10.3390/metabo10040158>.
- [252] E. Defossez, J. Bourquin, S. von Reuss, S. Rasmann, G. Glauser, Eight key rules for successful data-dependent acquisition in mass spectrometry-based metabolomics, *Mass Spectrometry Reviews*. (2021). <https://doi.org/10.1002/mas.21715>.
- [253] A. Tahir, A. Bileck, B. Muqaku, L. Niederstaetter, D. Kreutz, R.L. Mayer, D. Wolrab, S.M. Meier, A. Slany, C. Gerner, Combined Proteome and Eicosanoid Profiling Approach for Revealing Implications of Human Fibroblasts in Chronic Inflammation, *Anal. Chem.* 89 (2017) 1945–1954. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04433>.
- [254] J. Cazes, *Encyclopedia of Chromatography*, CRC Press, 2009. [https://books.google.fr/books?id=KWG1DwAAQBAJ&pg=PA1924&lpg=PA1924&dq=NE-OTF+fluorescence&source=bl&ots=1n1Gv11LPP&sig=ACfU3U1CXjICjeIZwvswCntNhQq2IHKQ\\_Q&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwjf6KrAirHoAhWC5OAKHUVUDZ8Q6AEwAXoECAoQAQ#v=onepage&q=NE-OTF%20fluorescence&f=false](https://books.google.fr/books?id=KWG1DwAAQBAJ&pg=PA1924&lpg=PA1924&dq=NE-OTF+fluorescence&source=bl&ots=1n1Gv11LPP&sig=ACfU3U1CXjICjeIZwvswCntNhQq2IHKQ_Q&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwjf6KrAirHoAhWC5OAKHUVUDZ8Q6AEwAXoECAoQAQ#v=onepage&q=NE-OTF%20fluorescence&f=false).
- [255] F.A. Fitzpatrick, M.A. Wynalda, Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D<sub>2</sub>. Identification of products formed in vitro., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 11713–11718.
- [256] R. Schmidt, O. Coste, G. Geisslinger, LC–MS/MS-analysis of prostaglandin E<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> in microdialysis samples of rats, *Journal of Chromatography B*. 826 (2005) 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.09.001>.
- [257] F. Xia, C. He, M. Ren, F.-G. Xu, J.-B. Wan, Quantitative profiling of eicosanoids derived from n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids by twin derivatization strategy combined with LC-MS/MS in patients with type 2 diabetes mellitus, *Analytica Chimica Acta*. 1120 (2020) 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.064>.
- [258] J.W. Dolan, A. Maule, D. Bingley, L. Wrisley, C.C. Chan, M. Angod, C. Lunte, R. Krisko, J.M. Winston, B.A. Homeier, D.V. McCalley, L.R. Snyder, Choosing an equivalent replacement column for a reversed-phase liquid chromatographic assay procedure, *Journal of Chromatography A*. 1057 (2004) 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.064>.
- [259] J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: IV. Type-B alkyl-silica columns, *Journal of Chromatography A*. 1000 (2003) 757–778. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00512-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00512-0).
- [260] S. Moncada, Biology and therapeutic potential of prostacyclin, *Stroke*. 14 (1983) 157–168. <https://doi.org/10.1161/01.str.14.2.157>.
- [261] M.P. Purdon, Application of HPLC to Lipid Separation and Analysis: Mobile and Stationary Phase, *Analyses of Fats, Oils and Derivatives*. (1993) 166.
- [262] E.G. Perkins, *Analyses of Fats, Oils and Derivatives*, The American Oil Chemists Society, 1993. [https://books.google.fr/books?id=loKZ8rbvTHwC&pg=PA186&lpg=PA186&dq=ecn+fatty+acid&source=bl&ots=G690FLX\\_rv&sig=ACfU3U0uZbFiDSdz12ZC4EuuHwOQTu604Q&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwj99pfpucXgAhX06OAKHWIYCZgQ6AEwDXoECAyQAQ#v=onepage&q=ecn%20fatty%20acid&f=false](https://books.google.fr/books?id=loKZ8rbvTHwC&pg=PA186&lpg=PA186&dq=ecn+fatty+acid&source=bl&ots=G690FLX_rv&sig=ACfU3U0uZbFiDSdz12ZC4EuuHwOQTu604Q&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwj99pfpucXgAhX06OAKHWIYCZgQ6AEwDXoECAyQAQ#v=onepage&q=ecn%20fatty%20acid&f=false) (accessed April 19, 2020).
- [263] M. Martin, G. Thevenon, A. Tchaplal, Comparison of retention mechanisms of homologous series and triglycerides in non-aqueous reversed-phase liquid



- chromatography, *Journal of Chromatography A*. 452 (1988) 157–173. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)81445-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81445-X).
- [264] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*, John Wiley & Sons, 2007.
- [265] F. Gritti, S.J. Shiner, J.N. Fairchild, G. Guiochon, Evaluation of the kinetic performance of new prototype 2.1mm×100mm narrow-bore columns packed with 1.6µm superficially porous particles, *Journal of Chromatography A*. 1334 (2014) 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.065>.
- [266] S. Bruns, D. Stoeckel, B.M. Smarsly, U. Tallarek, Influence of particle properties on the wall region in packed capillaries, *Journal of Chromatography A*. 1268 (2012) 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.027>.
- [267] T. Bursh, K. Larsson, M. Lundquist, Polymorphism in monomolecular triglyceride films on water and formation of multimolecular films, *Chemistry and Physics of Lipids*. 2 (1968) 102–113. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(68\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(68)90036-4).
- [268] Alain. Tchaplal, Henri. Colin, Georges. Guiochon, Linearity of homologous series retention plots in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 56 (1984) 621–625. <https://doi.org/10.1021/ac00268a007>.
- [269] D.L. Dorset, W.A. Pangborn, A.J. Hancock, T.C. van Soest, S.M. Greenwald, Glycerol Conformation and the Crystal Structure of Lipids II. A Further Study of Tripalmitin and Conformationally Fixed Analogs by Small-Angle X-Ray Diffraction and Reflection Electron Diffraction, *Zeitschrift Für Naturforschung C*. 33 (1978) 50–55. <https://doi.org/10.1515/znc-1978-1-209>.
- [270] K. Nouwade, S. Tfaili, P. Chaminade, Investigation of stationary phases performance for eicosanoids profiling in RP-HPLC, *Anal Bioanal Chem*. 413 (2021) 6551–6569. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03618-8>.
- [271] W.R. Mathews, J. Rokach, R.C. Murphy, Analysis of leukotrienes by high-pressure liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*. 118 (1981) 96–101. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90162-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90162-7).
- [272] W.S. Powell, Reversed-phase high-pressure liquid chromatography of arachidonic acid metabolites formed by cyclooxygenase and lipoxygenases, *Analytical Biochemistry*. 148 (1985) 59–69. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90628-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90628-1).
- [273] L.C. Sander, S.A. Wise, Subambient temperature modification of selectivity in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1749–1754. <https://doi.org/10.1021/ac00190a031>.
- [274] J.C. Fetzer, W.R. Biggs, The use of large polycyclic aromatic hydrocarbons to study retention in non-aqueous reversed-phase HPLC, *Chromatographia*. 27 (1989) 118–122. <https://doi.org/10.1007/BF02265862>.
- [275] W.S. Powell, L. Wang, S.P. Khanapure, S. Manna, J. Rokach, High-Pressure Liquid Chromatography of Oxo-Eicosanoids Derived from Arachidonic Acid, *Analytical Biochemistry*. 247 (1997) 17–24. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2024>.
- [276] A. Criscuolo, M. Zeller, K. Cook, G. Angelidou, M. Fedorova, Rational selection of reverse phase columns for high throughput LC–MS lipidomics, *Chemistry and Physics of Lipids*. 221 (2019) 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.006>.
- [277] C. Martano, V. Mugoni, F. Dal Bello, M.M. Santoro, C. Medana, Rapid high performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry methodology for multiple prenol lipids analysis in zebrafish embryos, *Journal of Chromatography A*. 1412 (2015) 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.115>.
- [278] K. Sandra, A. dos S. Pereira, G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass

- spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 4087–4099. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.039>.
- [279] H. Nie, R. Liu, Y. Yang, Y. Bai, Y. Guan, D. Qian, T. Wang, H. Liu, Lipid profiling of rat peritoneal surface layers by online normal- and reversed-phase 2D LC QToF-MS, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 2833–2844. <https://doi.org/10.1194/jlr.D007567>.
- [280] M. Ovčáčíková, M. Lísa, E. Cífková, M. Holčápek, Retention behavior of lipids in reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1450 (2016) 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.082>.
- [281] M. Narváez-Rivas, Q. Zhang, Comprehensive untargeted lipidomic analysis using core-shell C30 particle column and high field orbitrap mass spectrometer, *Journal of Chromatography A*. 1440 (2016) 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.054>.
- [282] M. Reinicke, J. Dorow, K. Bischof, J. Leyh, I. Bechmann, U. Ceglarek, Tissue pretreatment for LC–MS/MS analysis of PUFA and eicosanoid distribution in mouse brain and liver, *Anal Bioanal Chem.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02170-w>.
- [283] ThermoFisher, Sonde d’ionisation par électrospray à chaud (HESI-II), (n.d.). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGABBACNMAGY> (accessed March 2, 2022).
- [284] M.P. Jedrychowski, E.L. Huttlin, W. Haas, M.E. Sowa, R. Rad, S.P. Gygi, Evaluation of HCD- and CID-type Fragmentation Within Their Respective Detection Platforms For Murine Phosphoproteomics, *Mol Cell Proteomics*. 10 (2011) M111.009910. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009910>.
- [285] M. Masoodi, A.A. Mir, N.A. Petasis, C.N. Serhan, A. Nicolaou, Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 22 (2008) 75–83. <https://doi.org/10.1002/rcm.3331>.
- [286] A. Kij, K. Kus, I. Czyzyska-Cichon, S. Chlopicki, M. Walczak, Development and validation of a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS bioanalytical method for eicosanoid quantification - assessment of arachidonic acid metabolic pathway activity in hypertensive rats, *Biochimie*. 171–172 (2020) 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.03.010>.
- [287] ANSES, Guide de validation des méthodes d’analyses, Anses – Pôle Recherche et Référence. (2015). [https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES\\_GuideValidation.pdf](https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf) (accessed February 14, 2022).
- [288] Food and Drug Administration, Guidance for industry: bioanalytical method validation, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>. (2001).
- [289] EMA, Bioanalytical method validation, European Medicines Agency. (2018). <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation> (accessed February 14, 2022).
- [290] B.S. Levison, R. Zhang, Z. Wang, X. Fu, J.A. DiDonato, S.L. Hazen, Quantification of fatty acid oxidation products using online high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Free Radical Biology and Medicine*. 59 (2013) 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.001>.
- [291] Y. Wang, A.M. Armando, O. Quehenberger, C. Yan, E.A. Dennis, Comprehensive ultra-performance liquid chromatographic separation and mass spectrometric analysis of eicosanoid metabolites in human samples, *Journal of Chromatography A*. 1359 (2014) 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.006>.

- [292] M. Yamada, Y. Kita, T. Kohira, K. Yoshida, F. Hamano, S.M. Tokuoka, T. Shimizu, A comprehensive quantification method for eicosanoids and related compounds by using liquid chromatography/mass spectrometry with high speed continuous ionization polarity switching, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 995–996 (2015) 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.015>.
- [293] D. Balgoma, J. Larsson, J. Rokach, J.A. Lawson, K. Daham, B. Dahlén, S.-E. Dahlén, C.E. Wheelock, Quantification of Lipid Mediator Metabolites in Human Urine from Asthma Patients by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Controlling Matrix Effects, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7866–7874. <https://doi.org/10.1021/ac401461b>.
- [294] I.C. Forstenlehner, J. Holzmann, K. Scheffler, W. Wieder, H. Toll, C.G. Huber, A Direct-Infusion- and HPLC-ESI-Orbitrap-MS Approach for the Characterization of Intact PEGylated Proteins, *Anal. Chem.* 86 (2014) 826–834. <https://doi.org/10.1021/ac403390y>.
- [295] T.M. Miller, M.K. Donnelly, E.A. Crago, D.M. Roman, P.R. Sherwood, M.B. Horowitz, S.M. Poloyac, Rapid, simultaneous quantitation of mono and dioxygenated metabolites of arachidonic acid in human CSF and rat brain, *Journal of Chromatography B.* 877 (2009) 3991–4000. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.012>.
- [296] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917. <https://doi.org/10.1139/y59-099>.
- [297] V. Pichon, C. Cau Dit Coumes, L. Chen, S. Guenu, M.-C. Hennion, Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides, *Journal of Chromatography A.* 737 (1996) 25–33. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01339-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01339-3).
- [298] H. Dakroub, M. Nowak, J.-F. Benoist, B. Noël, B. Védie, J.-L. Paul, N. Fournier, Eicosapentaenoic acid membrane incorporation stimulates ABCA1-mediated cholesterol efflux from human THP-1 macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1866 (2021) 159016. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159016>.
- [299] V.J. Hammond, V.B. O'Donnell, Esterified eicosanoids: Generation, characterization and function, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1818 (2012) 2403–2412. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.013>.
- [300] E.J. Goetzl, R.A. Lewis, M. Rola-Pleszczynski, New York Academy of Sciences, eds., Cellular generation, transport, and effects of eicosanoids: biological roles and pharmacological intervention, New York Academy of Sciences, New York, 1994.
- [301] T. Kohira, Y. Kita, S.M. Tokuoka, M. Shiba, M. Satake, T. Shimizu, Characterization of supported liquid extraction as a sample pretreatment method for eicosanoids and related metabolites in biological fluids, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1124 (2019) 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.016>.
- [302] L. Kritharides, A. Christian, G. Stoudt, D. Morel, G.H. Rothblat, Cholesterol Metabolism and Efflux in Human THP-1 Macrophages, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 18 (1998) 1589–1599. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.10.1589>.
- [303] G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Analytical Biochemistry.* 83 (1977) 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).
- [304] W.E.M. Lands, METABOLISM OF GLYCEROLIPIDES: A COMPARISON OF LECITHIN AND TRIGLYCERIDE SYNTHESIS, *Journal of Biological Chemistry.* 231 (1958) 883–888.
- [305] B. Wang, P. Tontonoz, Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease, *Annu. Rev. Physiol.* 81 (2019) 165–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114444>.

- [306] M. Hermansson, K. Hokynar, P. Somerharju, Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells, *Progress in Lipid Research*. 50 (2011) 240–257. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.02.004>.
- [307] Y.-H. Sha, Y.-W. Hu, J.-J. Gao, Y.-C. Wang, X. Ma, Y.-R. Qiu, S.-F. Li, J.-Y. Zhao, C. Huang, J.-J. Zhao, J.-B. Lu, C.-M. Kang, L. Zheng, Q. Wang, Lipoxin A4 promotes ABCA1 expression and cholesterol efflux through the LXR $\alpha$  signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells, *Int J Clin Exp Pathol*. 8 (2015) 6708–6715.
- [308] L.C. Sander, S.A. Wise, Effect of phase length on column selectivity for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem*. 59 (1987) 2309–2313. <https://doi.org/10.1021/ac00145a020>.
- [309] L.C. Sander, S.A. Wise, Synthesis and characterization of polymeric C18 stationary phases for liquid chromatography, *Anal. Chem*. 56 (1984) 504–510. <https://doi.org/10.1021/ac00267a047>.
- [310] L.C. Sander, S.A. Wise, Influence of Stationary Phase Chemistry on Shape Recognition in Liquid Chromatography, *Anal. Chem*. 67 (1995) 3284–3292. <https://doi.org/10.1021/ac00114a027>.
- [311] K.B. Sentell, J.G. Dorsey, Retention mechanisms in reversed-phase liquid chromatography. Stationary-phase bonding density and partitioning, *Anal. Chem*. 61 (1989) 930–934. <https://doi.org/10.1021/ac00184a003>.
- [312] K.P. Bateman, M. Kellmann, H. Muenster, R. Papp, L. Taylor, Quantitative-qualitative data acquisition using a benchtop orbitrap mass spectrometer, *J Am Soc Mass Spectrom*. 20 (2009) 1441–1450. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.03.002>.
- [313] W.S. Powell, Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica, *Prostaglandins*. 20 (1980) 947–957. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(80\)90144-6](https://doi.org/10.1016/0090-6980(80)90144-6).
- [314] W.S. Powell, Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecylsilyl silica, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 1982: pp. 467–477. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)86218-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)86218-6).
- [315] E.S. Chan, H. Zhang, P. Fernandez, S.D. Edelman, M.H. Pillinger, L. Ragolia, T. Palaia, S. Carsons, A.B. Reiss, Effect of cyclooxygenase inhibition on cholesterol efflux proteins and atheromatous foam cell transformation in THP-1 human macrophages: a possible mechanism for increased cardiovascular risk, *Arthritis Res Ther*. 9 (2007) R4. <https://doi.org/10.1186/ar2109>.

# ANNEXES

# I. Développement de méthodes en RP-HPLC

## 1. Gradient linéaire évalué sur les 7 phases stationnaires.

Gradient linéaire			
Colonnes	Temps	A*	B*
	0	100	0
Toutes les	26	5	95
phases	27	5	95
stationnaires	28	100	0
	35	100	0

*\*Pour la composition de la phase mobile, voir annexe I.4.*

## 2. Gradient optimisé pour chaque phase stationnaire.

Gradients optimisés									
Type de colonne	Colonnes	Temps	A*	B*	Type de colone	Colonnes	Temps	A*	B*
<i>Silices partiellement poreuses</i>	Accucore™ C30	0	100	0	<i>Silices totalement poreuses</i>	Zorbax RP Fusion	0	100	0
		1	70	30			1	70	30
		2,5	55	45			4	30	70
		5	15	85			9	5	95
		9	5	95			10	5	95
		10	5	95			11	100	0
		11	100	0			15	100	0
		18	100	0			0	100	0
	Accucore™ C18	0	100	0		Nucleodur Isis C18	4,5	55	45
		1	70	30			10	5	95
		2,5	55	45			11	5	95
		5	15	85			12	100	0
		9	5	95			16	100	0
		10	5	95			0	100	0
		11	100	0			2	60	40
		18	100	0			4	40	60
	Accucore™ C18 Polar	0	100	0		HypersilGold C18 - 3µm	7	10	90
		1	70	30			10	10	90
		2,5	55	45			11	100	0
		5	15	85			15	100	0
		9	5	95			0	0	0
		10	5	95			3	55	45
		11	100	0			7	5	95
		18	100	0			8	5	95
Cortecs Shield RP18	0	0	0	9	100	0			
	3	55	45	16	100	0			
	7	5	95						
	8	5	95						
	9	100	0						

\*Pour la composition de la phase mobile, voir Annexe I.4.

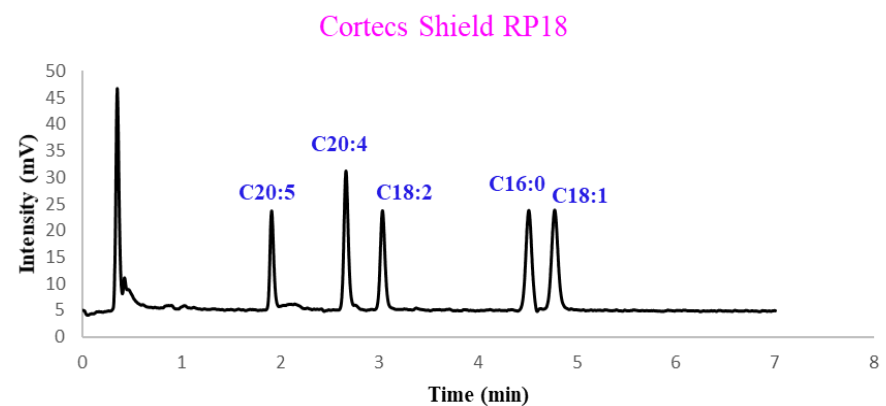
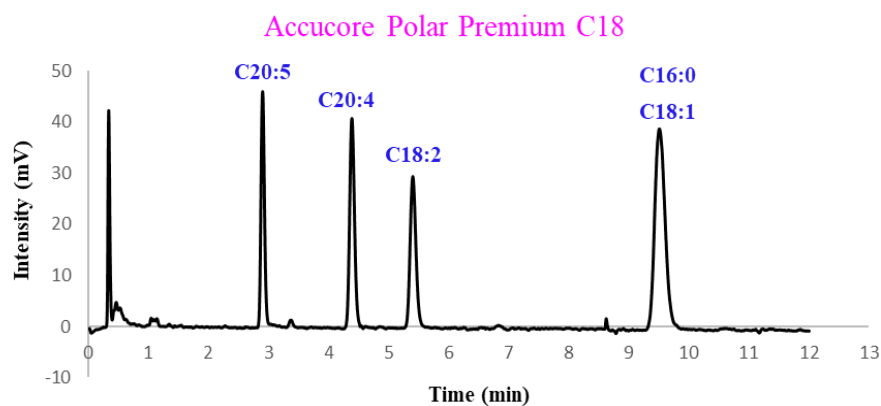
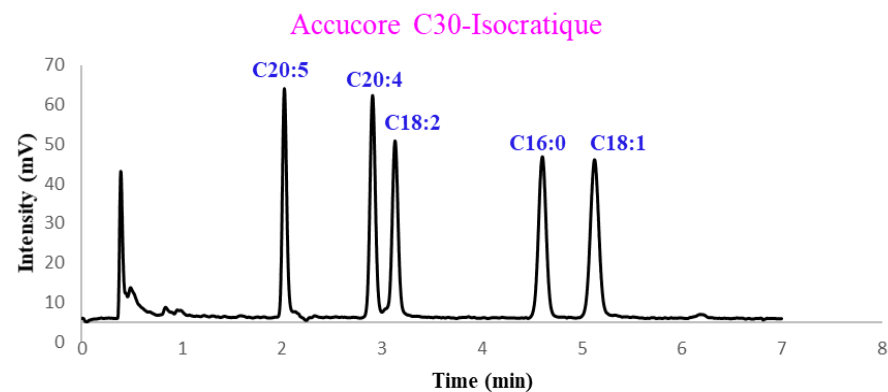
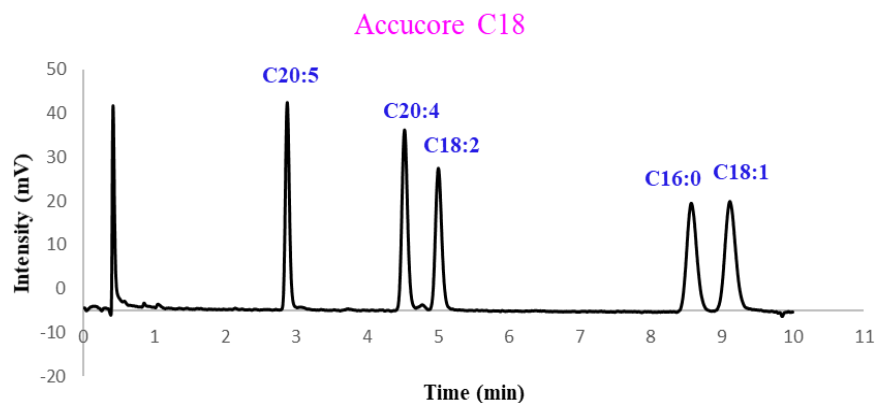
### 3. Composition de la phase mobile pour tout le développement en RP-HPLC.

Phases stationnaires	Mode isocratique	Mode gradient linéaire	Mode gradient optimisé
Accucore™ C30			Phase A : Eau/Acétonitrile/Acide formique (69,96 :30 :0,04, v/v/v) Phase B : Acétonitrile/ Acide formique (99,96 :0,04, v/v/v)
Accucore™ C18			Phase A : Eau/Acétonitrile/Acide formique (69,96 :30 :0,04, v/v/v) Phase B : Acétonitrile/ Acide formique (99,96 :0,04, v/v/v)
Accucore™ Polar Premium		Phase A : Eau/Acétonitrile/Acide formique (69,96 :30 :0,04, v/v/v)	Phase A : Eau/Acétonitrile/Acide formique (69,96 :30 :0,04, v/v/v) Phase B : Acétonitrile/ Acide formique (99,96 :0,04, v/v/v)
Cortecs Shield C18	Analyse AGPI Acétonitrile/Eau/Acide formique (70 :29,96 :0,04 ; v/v/v)		ou  Phase A : Eau/Acétonitrile/Acide formique (69,96 :30 :0,04, v/v/v) Phase B : Acétonitrile/ Acide formique (99,96 :0,04, v/v/v)
Zorbax Bonus RP		Phase B : Acétonitrile/acide formique (99,96 :0,04, v/v)	Phase A : Eau/Acétonitrile/Acide formique (84,96 :15 :0,04, v/v/v) Phase B : Acétonitrile/ Acide formique (99,96 :0,04, v/v/v)
Nucleodur ISIS C18			Phase A : Eau/Acétonitrile/Acide formique (84,96 :15 :0,04, v/v/v) Phase B : Acétonitrile/ Acide formique (99,96 :0,04, v/v/v)
Hypersil Gold™ 3µm			Phase A : Eau/Acétonitrile/Acide formique (84,96 :15 :0,04, v/v/v) Phase B : Acétonitrile/ Acide formique (99,96 :0,04, v/v/v)
Accucore™ C30 (test MeOH)	-----	-----	Phase A : Eau/Méthanol/Acide formique (49,96 :50 :0,04, v/v/v) Phase B : Méthanol/ Acide formique (99,96 :0,04, v/v/v)

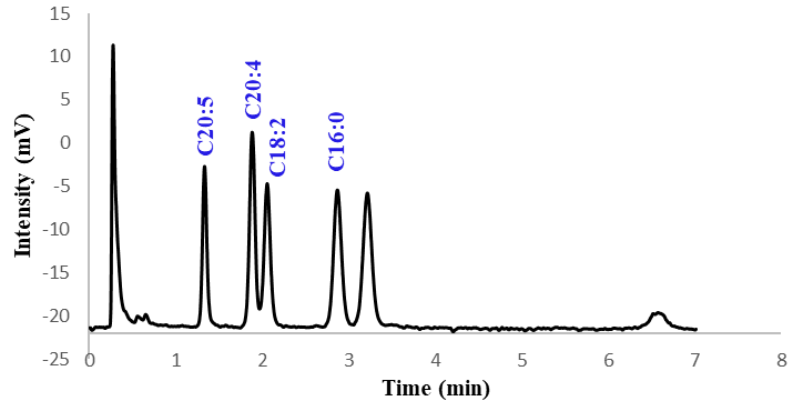


#### 4. Chromatogrammes de l'analyse en mode isocratique d'un mélange de cinq acides gras polyinsaturés sur les huit phases stationnaires.

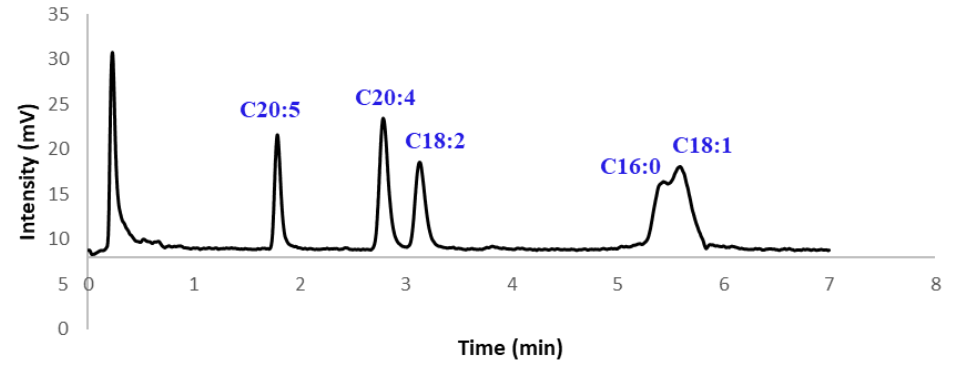
Phase mobile: A (Eau:ACN, 30:70,v/v) contenant 0,04% HCOOH ; T = 30°C ; V injecté = 1µL ; Débit = 0,5 mL/min



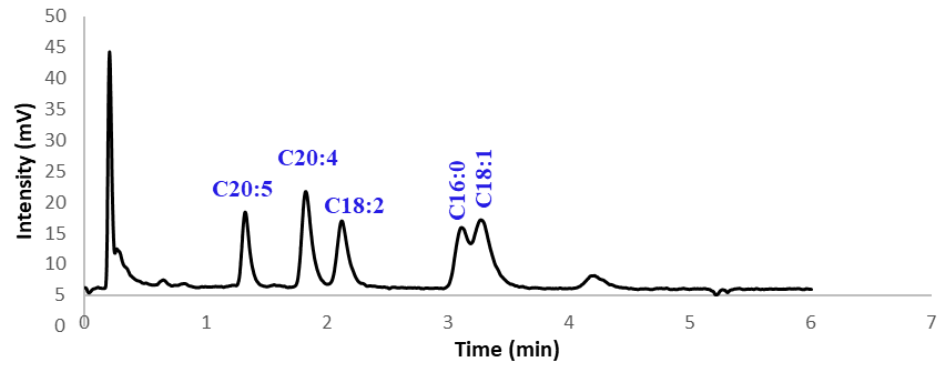
Hypersil Gold C18



Nucleodur ISIS C18

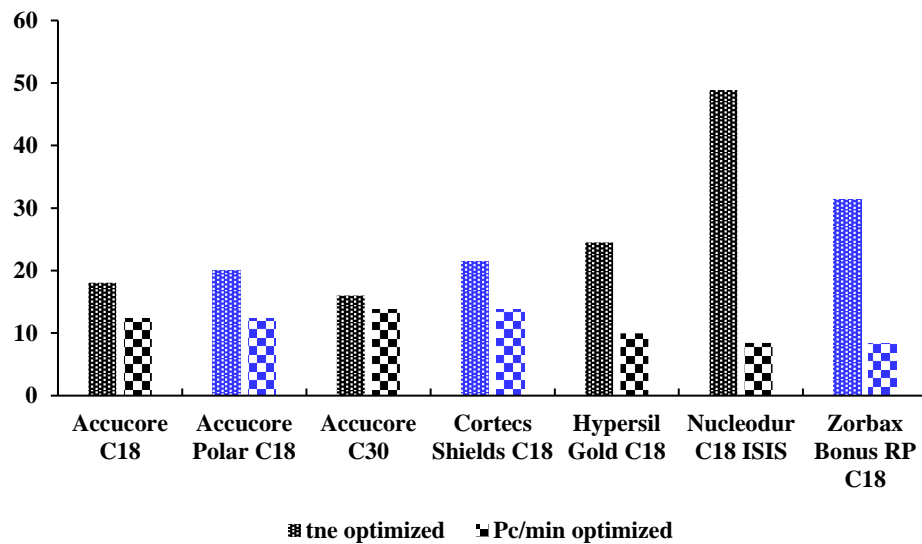


Zorbax Fusion RP



## 5. Résumé de TNE et la capacité de pic par minute pour l'ensemble des phases stationnaires.

La composition de la phase mobile ainsi que le gradient optimisé de chaque phase stationnaire sont répertoriés à l'Annexe I-3 et 4. T = 25°C ; V injecté = 1µL ; Débit = 0,5mL/min ).

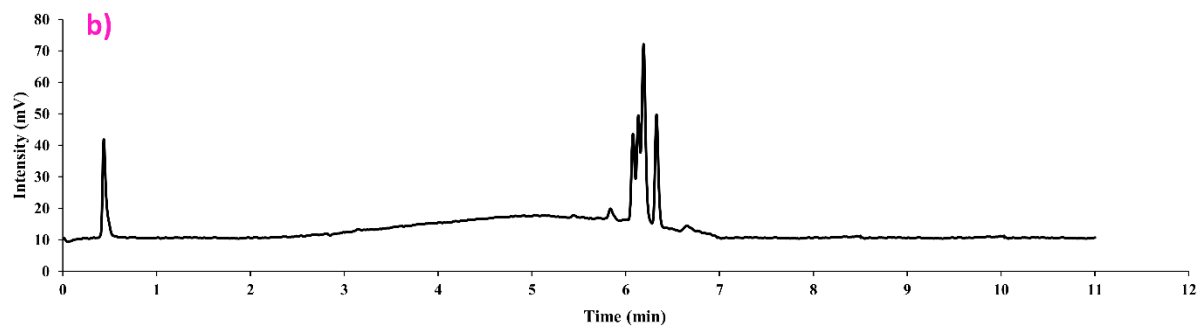
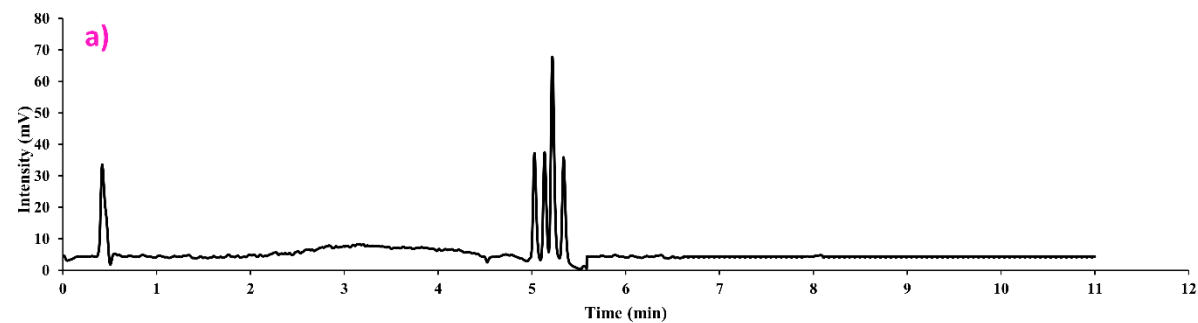


## 6. Tableau des valeurs de $F_s$ calculé pour les sept phases stationnaires et certaines utilisées en littérature

Fournisseur	Phases stationnaires	<i>Accucore C30</i>	<i>Accucore C18</i>	<i>Accucore Polar Premium</i>	<i>Cortecs UPLC Shield RP18</i>	<i>Zorbax Bonus RP</i>	<i>Nucleodur Isis</i>	<i>Hypersil GOLD</i>	<i>Acquity UPLC BEH C18</i>	<i>Synergi Polar-RP</i>	<i>Symmetry C18</i>
Thermo/Hypersil	<i>Accucore C30</i>	0									
Thermo/Hypersil	<i>Accucore C18</i>	3.61	0								
Thermo/Hypersil	<i>Accucore Polar Premium</i>	18.52	14.17	0							
Waters	<i>Cortecs UPLC Shield RP18</i>	11.93	6.53	3.02	0						
Agilent Technologies	<i>Zorbax Bonus RP</i>	472.82	415.35	322.15	335.66	0					
Macherey Nagel	<i>Nucleodur Isis</i>	4.90	0.57	9.61	3.44	389.57	0				
Thermo/Hypersil	<i>Hypersil GOLD</i>	1.49	1.15	13.27	6.55	431.58	1.67	0			
Waters	<i>Acquity UPLC BEH C19</i>	2.19	3.10	9.19	5.54	419.16	2.35	2.08	0		
Phenomenex	<i>Synergi Polar-RP</i>	4.61	4.62	10.87	4.10	400.52	3.32	2.74	2.73	0	
Waters	<i>Symmetry C19</i>	16.73	5.81	9.66	3.34	324.34	3.59	9.32	10.34	9.12	0

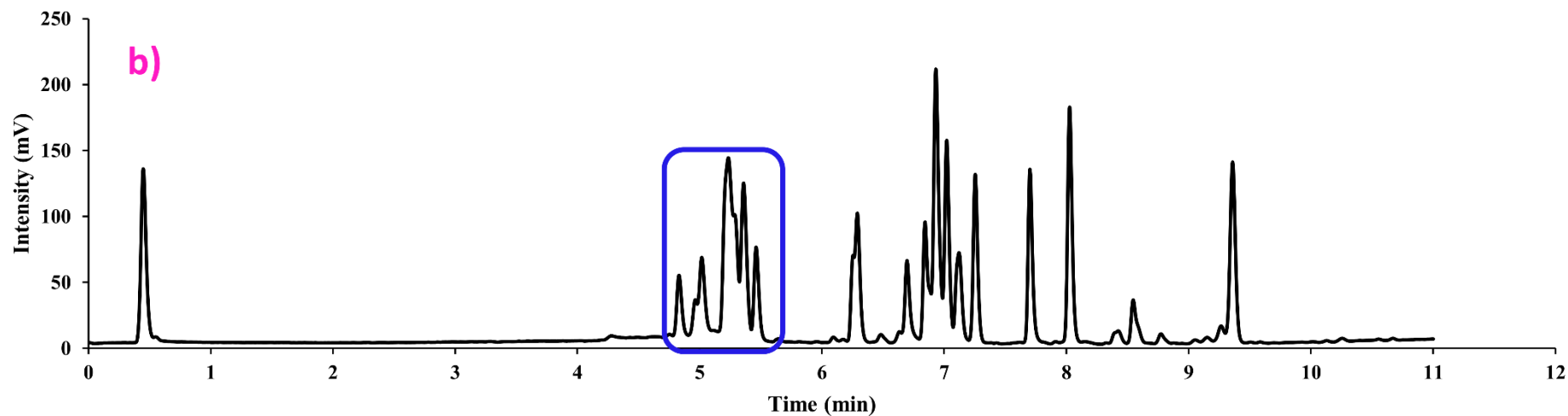
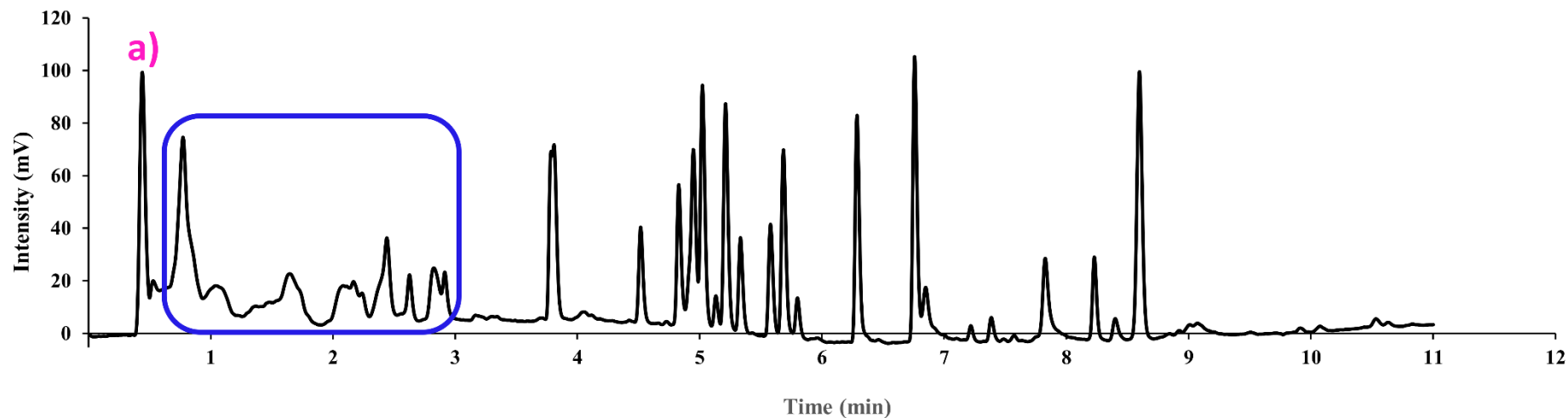
## 7. Effet du changement de phase organique sur la séparation des HETEs sur Accucore™ C30.

Phase mobile **a**) Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH, **b**) Phase mobile: A (Eau: MeOH, 50:50,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(MeoH,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 1μL ; Débit = 0,5mL/min ; T=25°C.



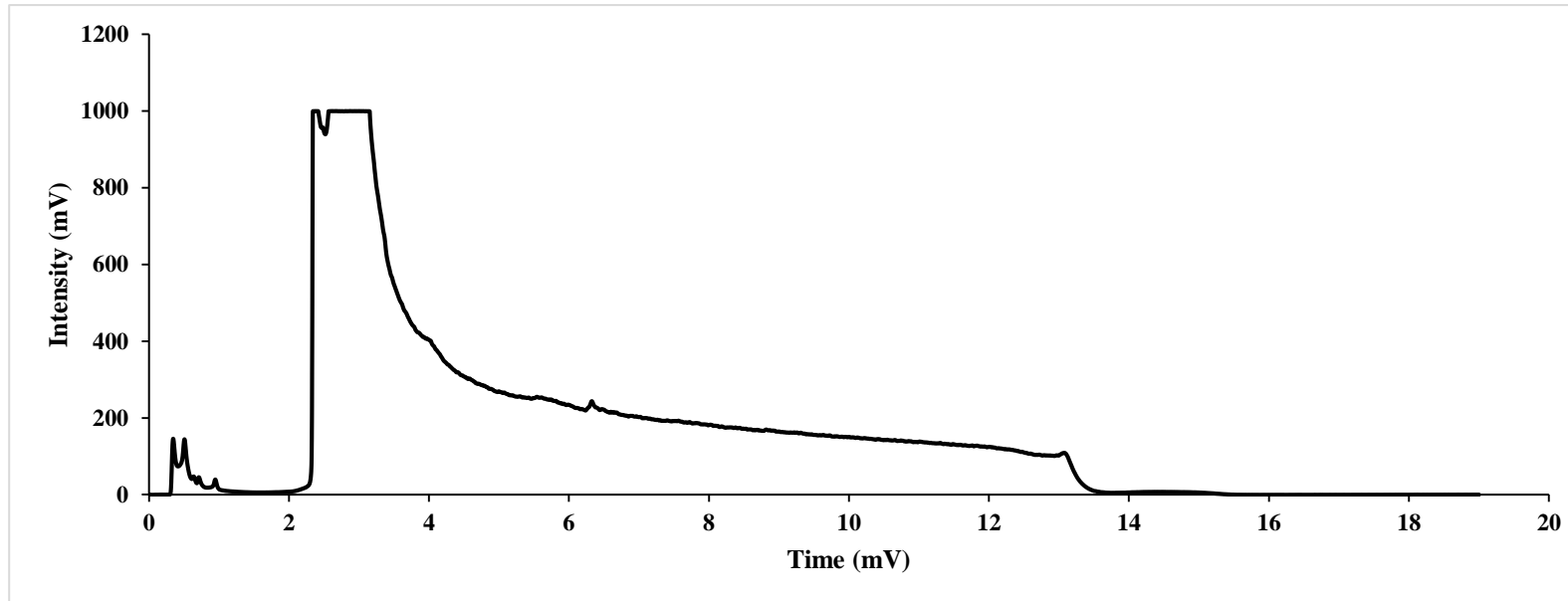
## 8. Evaluation de l'effet de la phase organique sur la rétention des eicosanoïdes sur Accucore™ C30.

Phase mobile **a)** Phase mobile: A (Eau:ACN, 70:30,v/v); B(Acétonitrile,100,v), , **b)** Phase mobile: A (Eau: MeOH, 50:50,v/v); B(MeOH,100,v). T = 25°C ; V injecté = 1 $\mu$ L ; Débit = 0,5mL/min , T=25°C



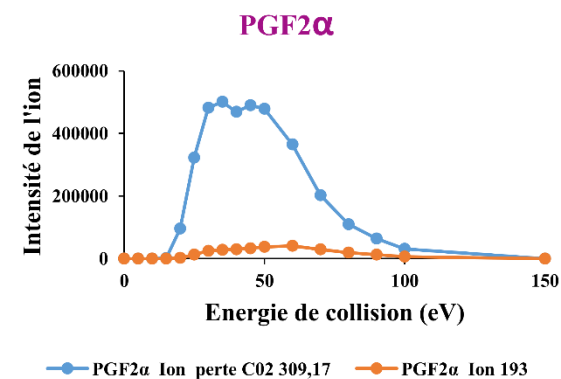
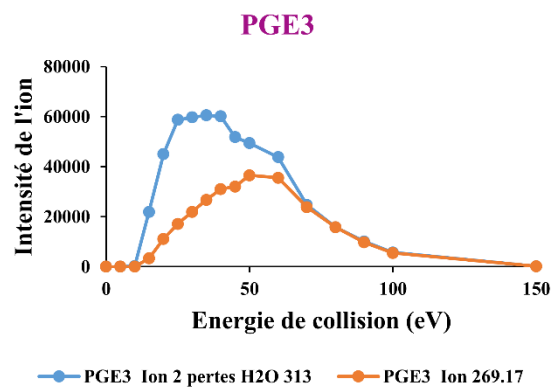
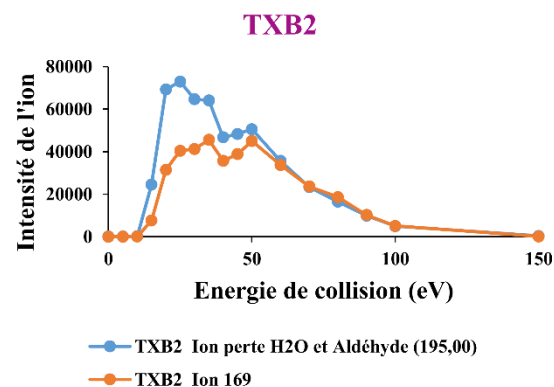
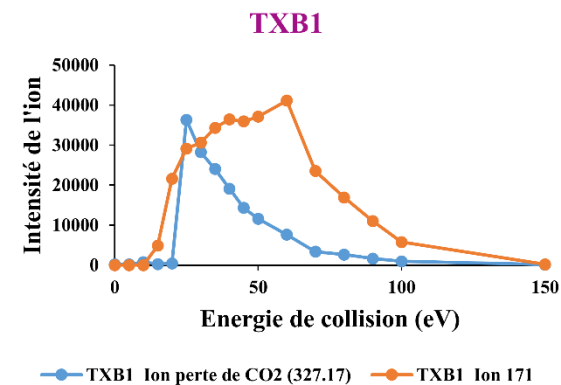
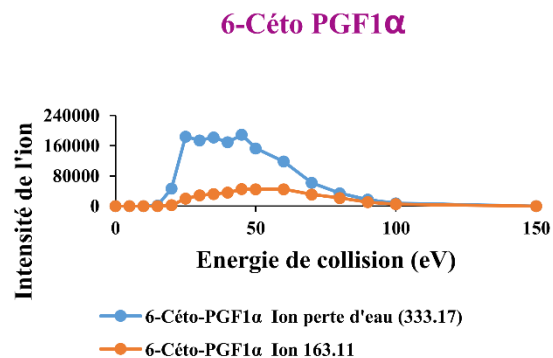
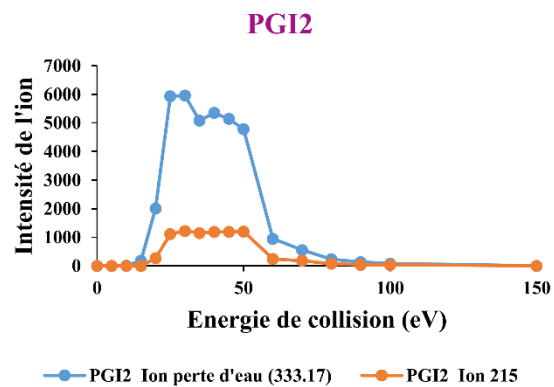
## II. Développement en chromatographie liquide à polarité de phases normale

### 1. Profil de séparation des eicosanoïdes sur Luna NH2 avec une phase mobile à base d'isooctane, méthanol et d'acétate d'éthyle

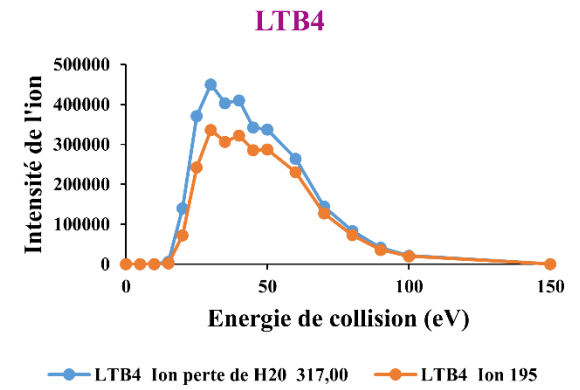
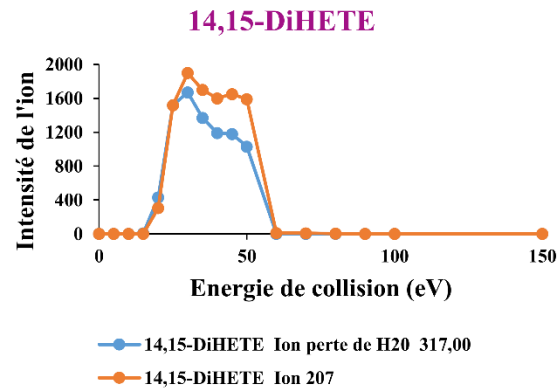
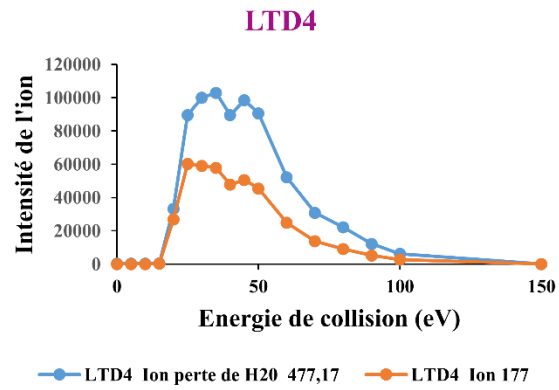
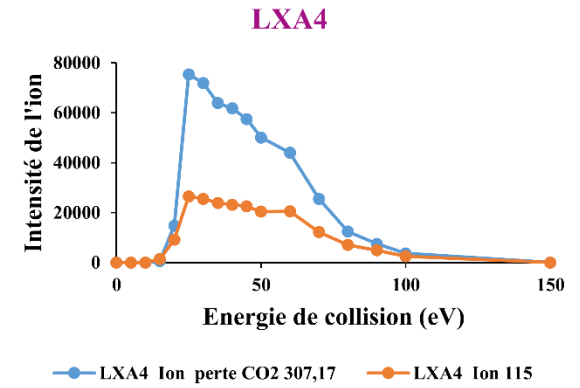
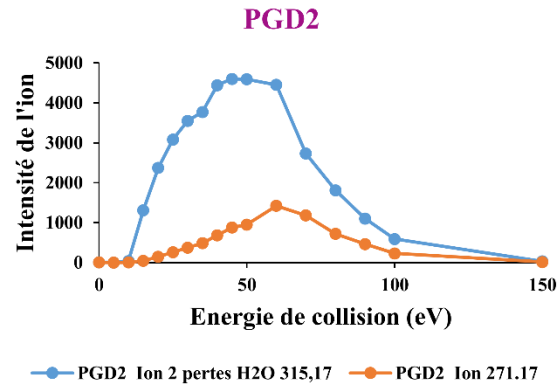
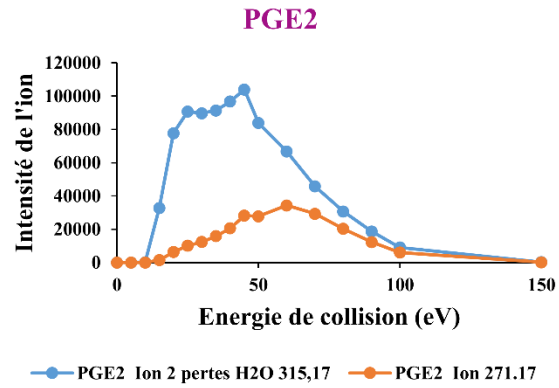


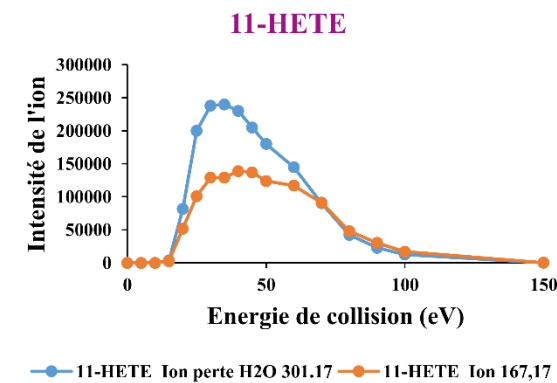
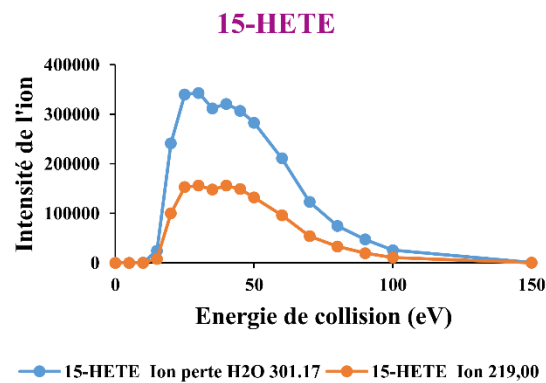
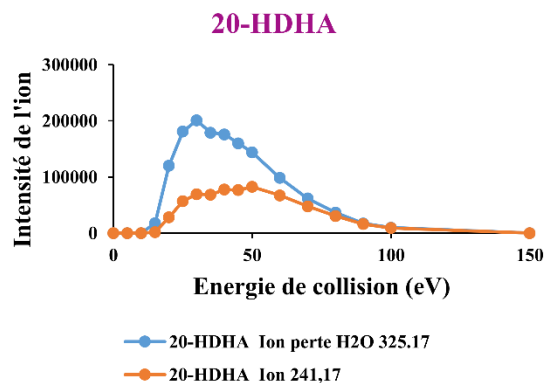
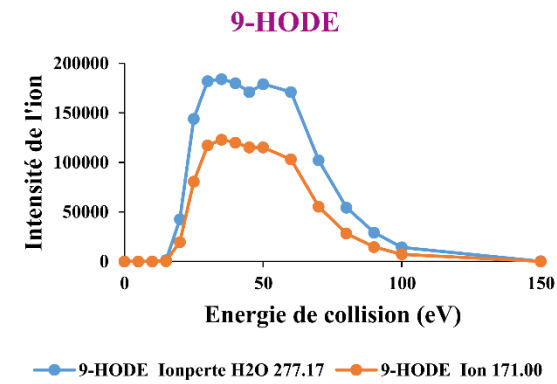
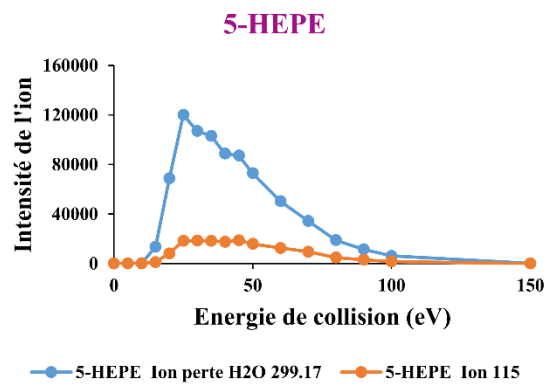
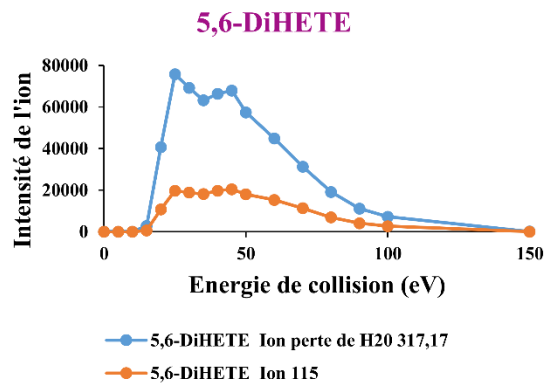
### III. Spectrométrie de masse

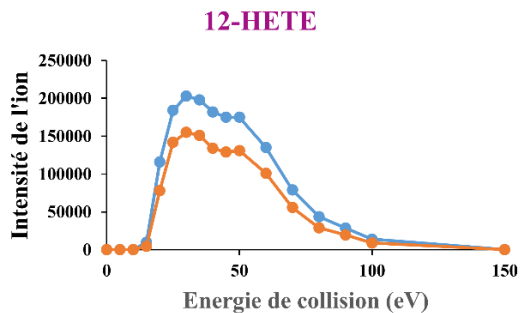
#### 1. Optimisation de l'énergie de fragmentation par CID



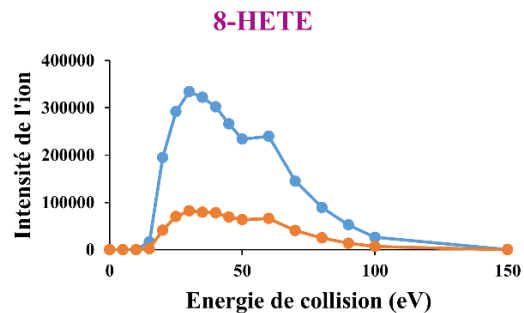




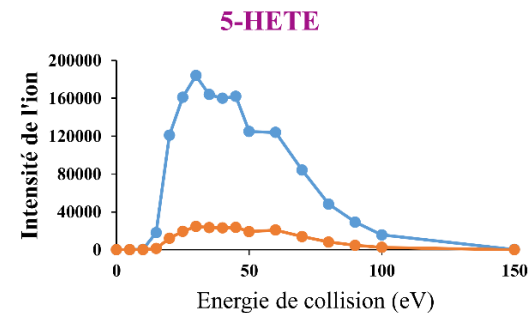




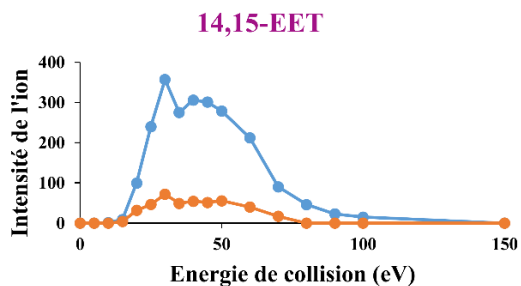
—●— 12-HETE Ion perte H2O 301.17 —●— 12-HETE Ion 179,00



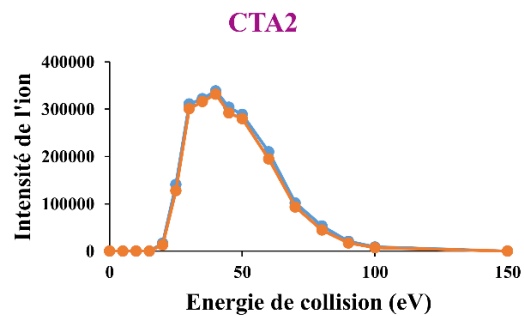
—●— 8-HETE Ion (301.17) —●— 8-HETE Ion 155,00



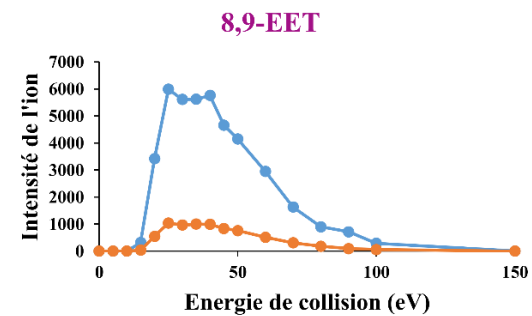
—●— 5-HETE Ion perte H2O 301.17 —●— 5-HETE Ion 115,00



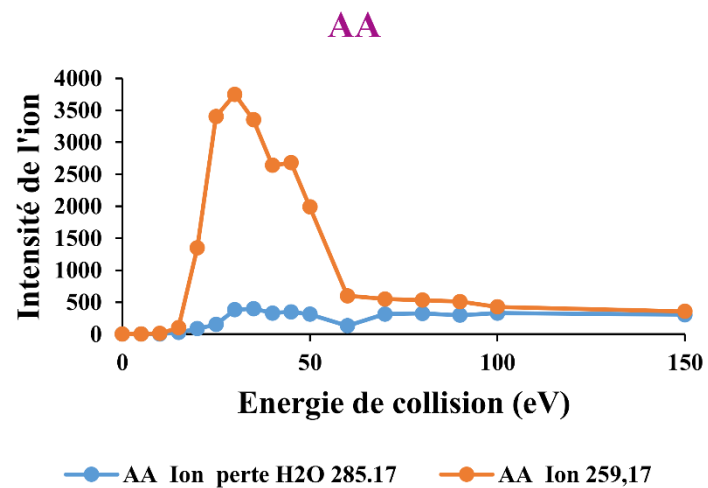
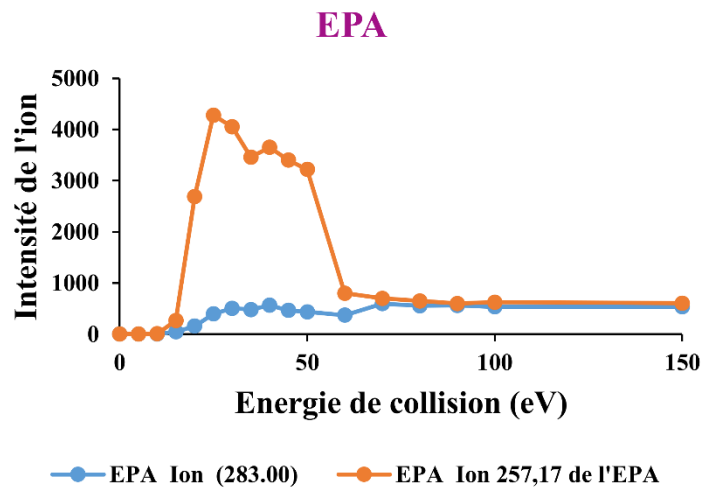
—●— 14,15-EET Ion perte H2O 301.17  
—●— 14,15-EET Ion 219,00



—●— CTA2 Ion perte H2O 329.17 —●— CTA2 Ion 247,17

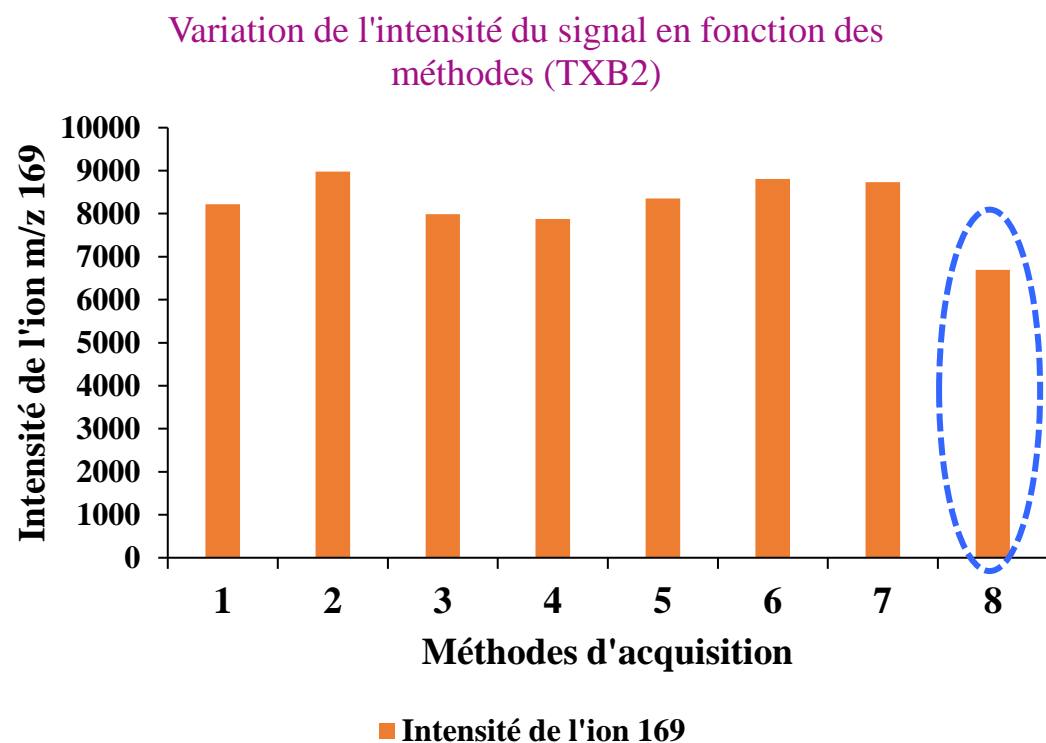


—●— 8,9-EET Ion perte H2O 301.17 —●— 8,9-EET Ion 155,00



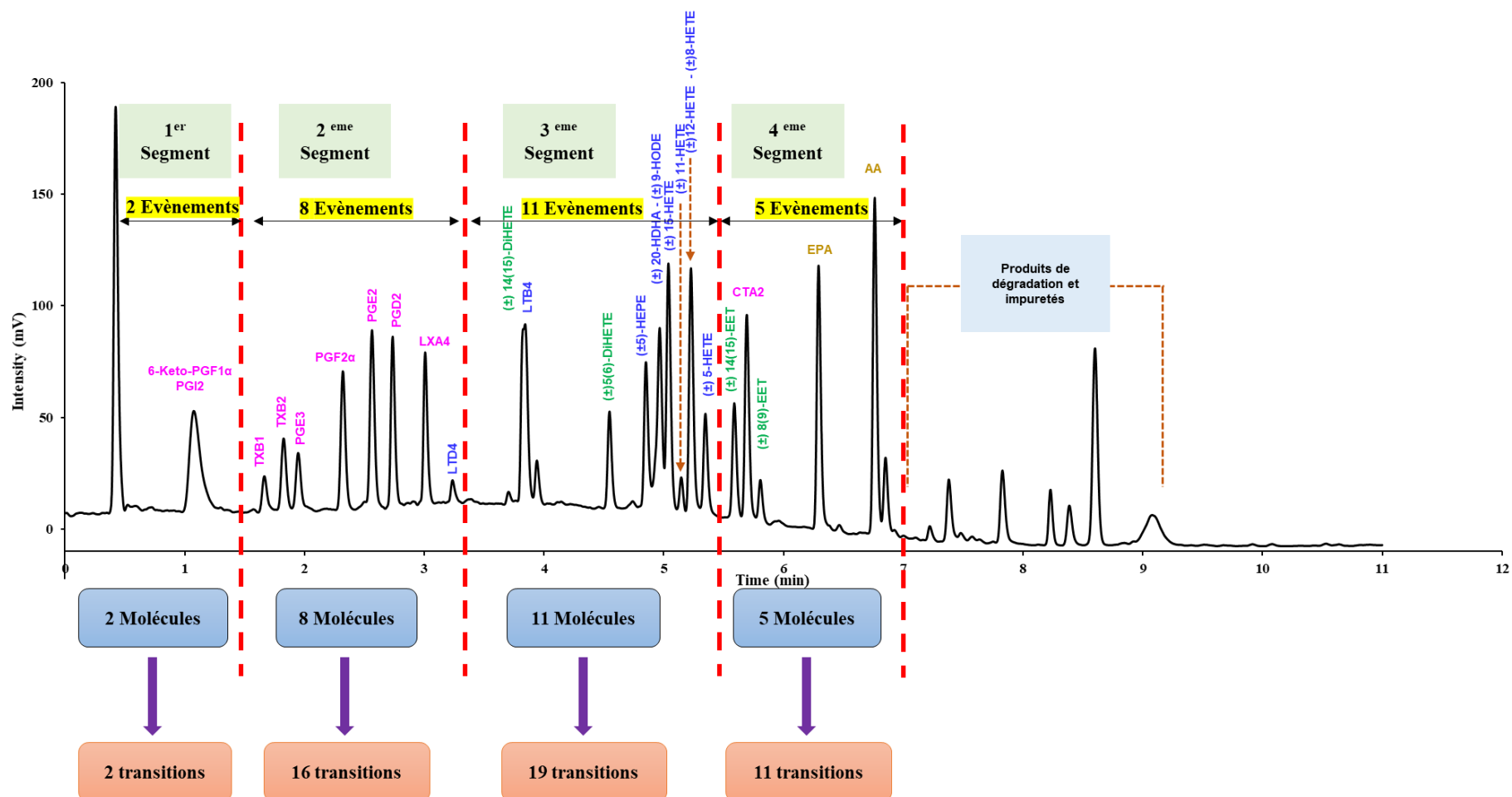
## 2. Evaluation de la sensibilité au cours du développement sur la trappe ionique

**1** : Full scan en basse résolution suivi d'un MS<sup>2</sup> et SRM (3 transitions), **2** : Full scan en basse résolution avec suivi de 3 transitions par molécules par SRM, **3** : Full scan en basse résolution + diminution du temps d'injection dans la trappe (25 ms à 10 ms) et réduction du nombre de microscans de 4 à 1 ; **4** : 3 transitions par molécules + temps d'injection à 10 ms et nombre de microscan à 1 ; **5** : mêmes conditions que précédemment avec réduction du nombre de transitions à deux par molécule ; **6** : deux transitions (SRM) par molécule avec utilisation du mode scan rapide ; **7** : deux transitions par molécule avec réduction du temps d'injection dans la trappe à 5 ms ; **8** : Réduction du nombre de transitions à 1 par molécule pour suivre l'ensemble des 26 molécules par SRM et une subdivision du profil chromatographique en 4 segments.



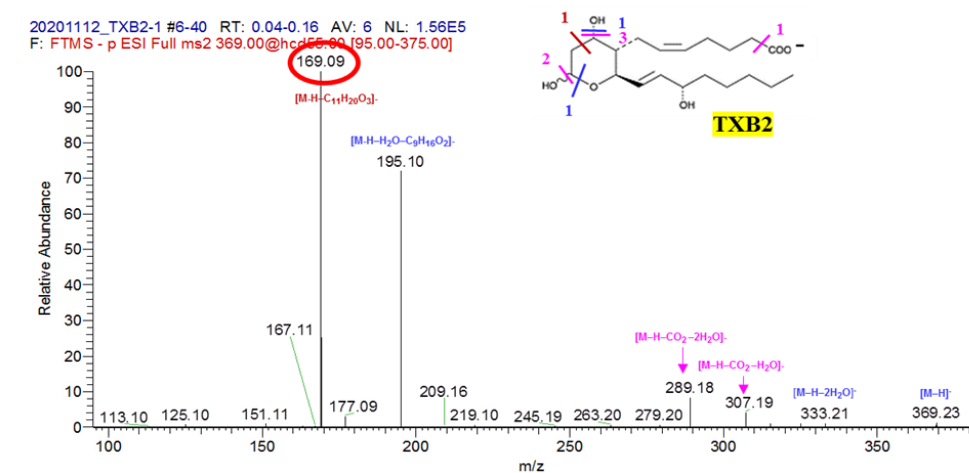
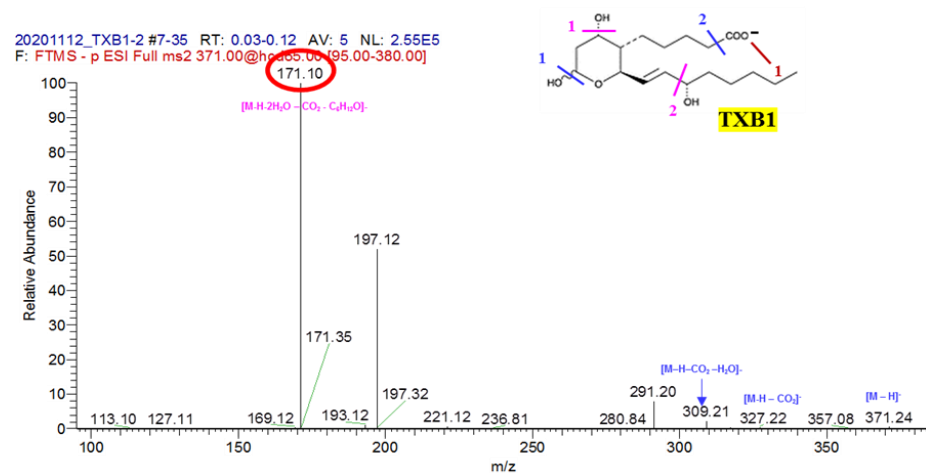
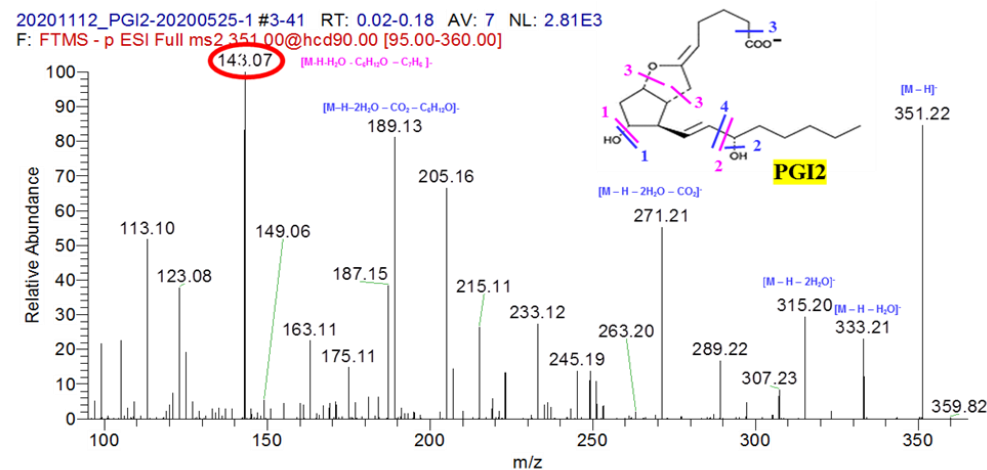
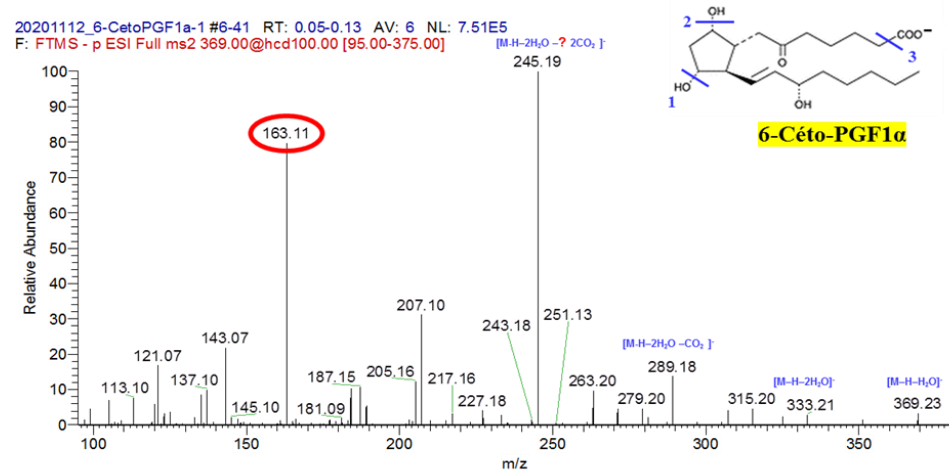
### 3. Illustration de la segmentation du profil chromatographique pour analyse par le LTQ en mode SRM

Chaque segment prend en compte plusieurs évènements et chaque évènement permet d'analyser une molécule de  $m/z$  donné au travers de ces transitions.

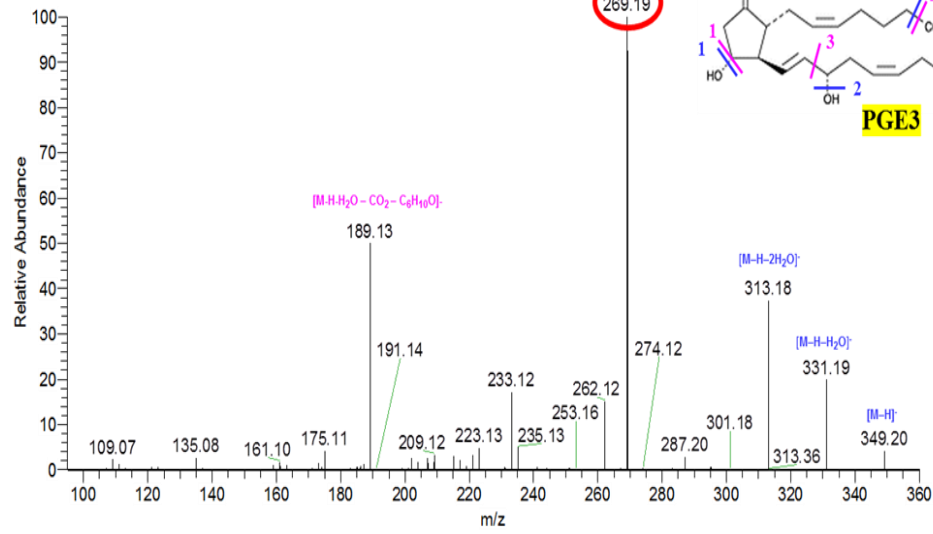


## 4. Spectre de fragmentation à l'énergie optimale de chaque standard par HCD SUR LE Itq-Orbitrap® Velos Pro

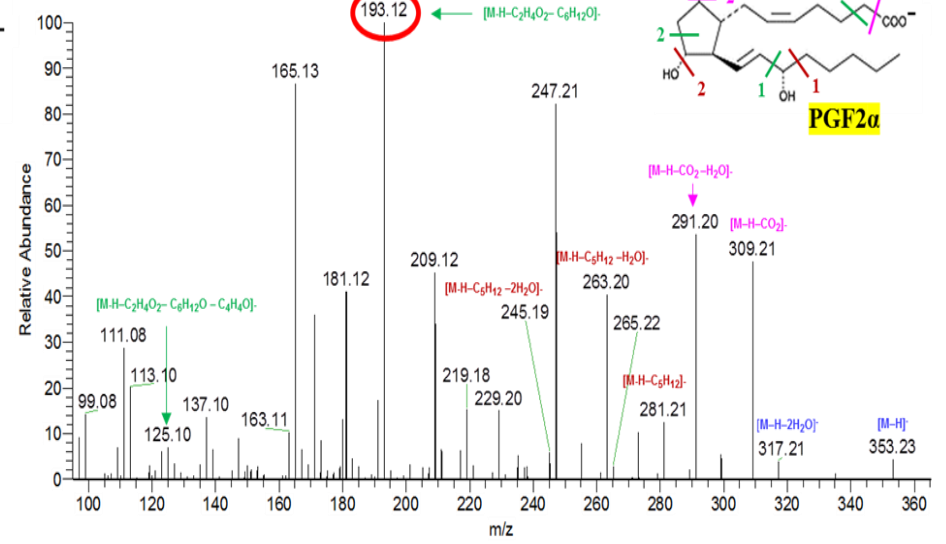
Les analyses ont été réalisées par FIA en tenant compte du pourcentage de solvant éluant chaque composé sur la phase stationnaire Accucore™ C30. Concentration = 50µg/mL ; Débit = 0,5 ML/min ; Vinj = 1 µL. Les spectres ont été acquis à haute résolution (avec une résolution de 7500).



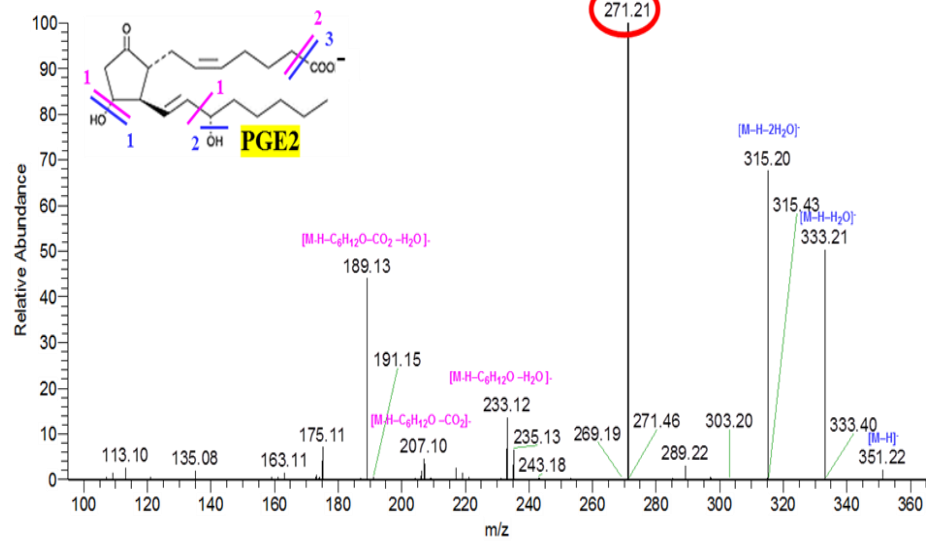
20201112\_PGE3-1#7-37 RT: 0.05-0.15 AV: 5 NL: 9.39E4  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 349.00@hcd60.00 [95.00-355.00]



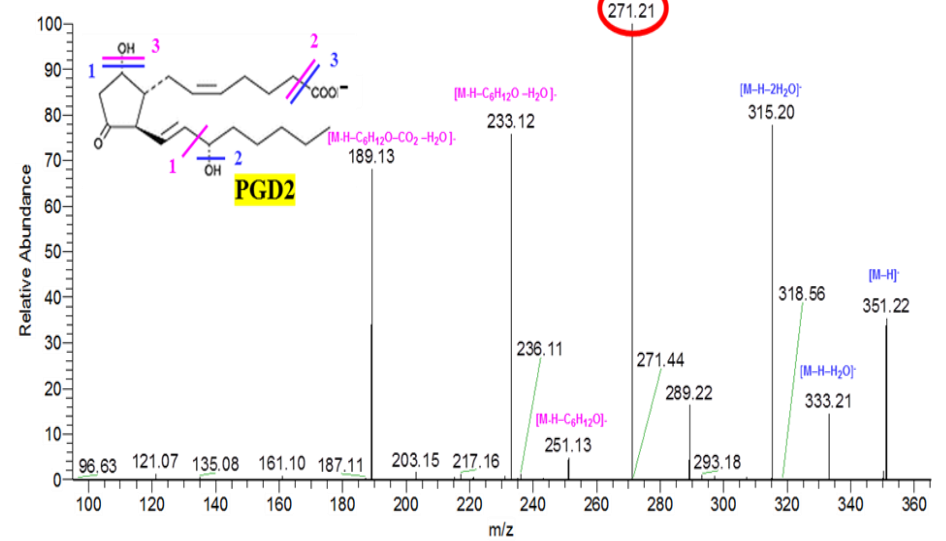
20201112\_PGF2-2#9-36 RT: 0.06-0.11 AV: 4 NL: 3.14E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 353.00@hcd105.00 [95.00-360.00]



20201112\_PGE2-1#7-36 RT: 0.05-0.14 AV: 5 NL: 1.04E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 351.00@hcd60.00 [95.00-360.00]

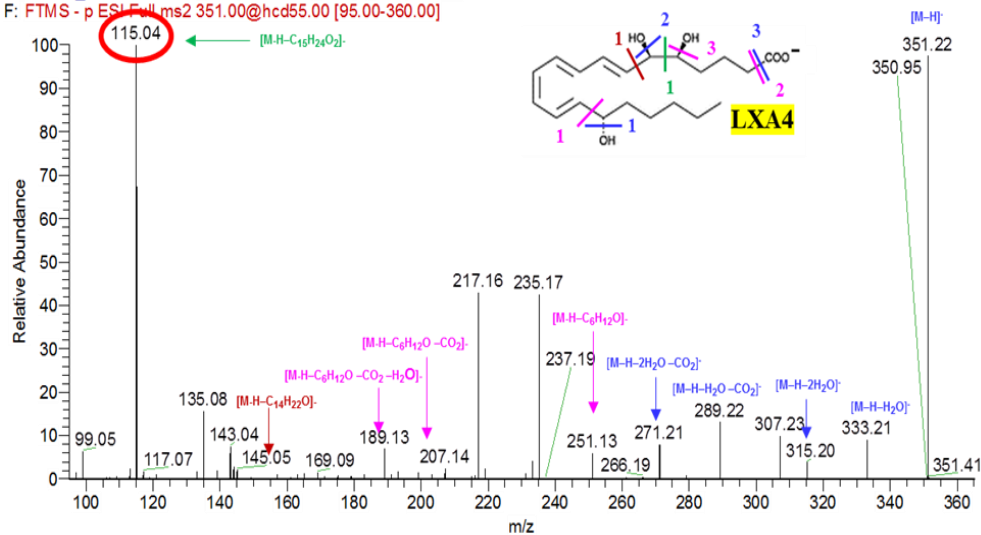


20201112\_PGD2-1#6-36 RT: 0.05-0.15 AV: 5 NL: 9.57E3  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 351.00@hcd60.00 [95.00-360.00]

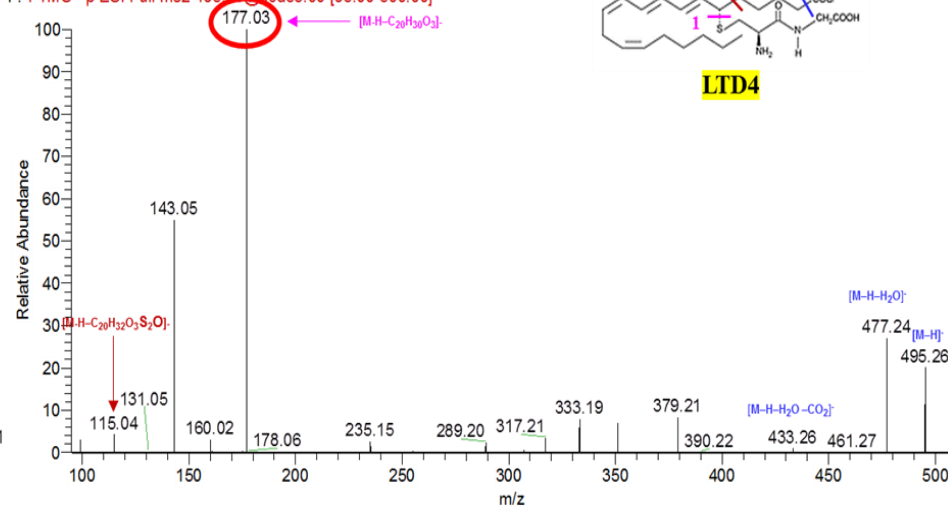




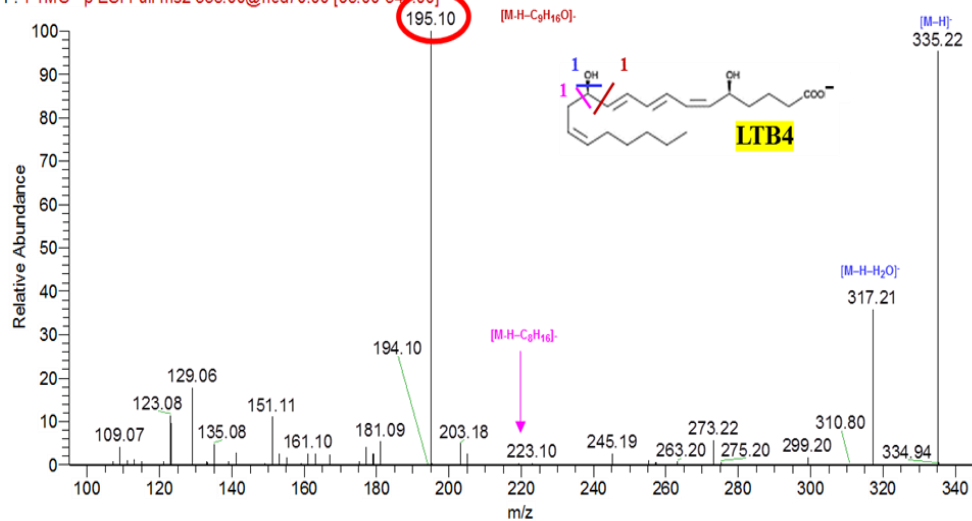
20201112\_LXA4-1 #11-27 RT: 0.07-0.09 AV: 2 NL: 1.95E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 351.00@hcd55.00 [95.00-360.00]



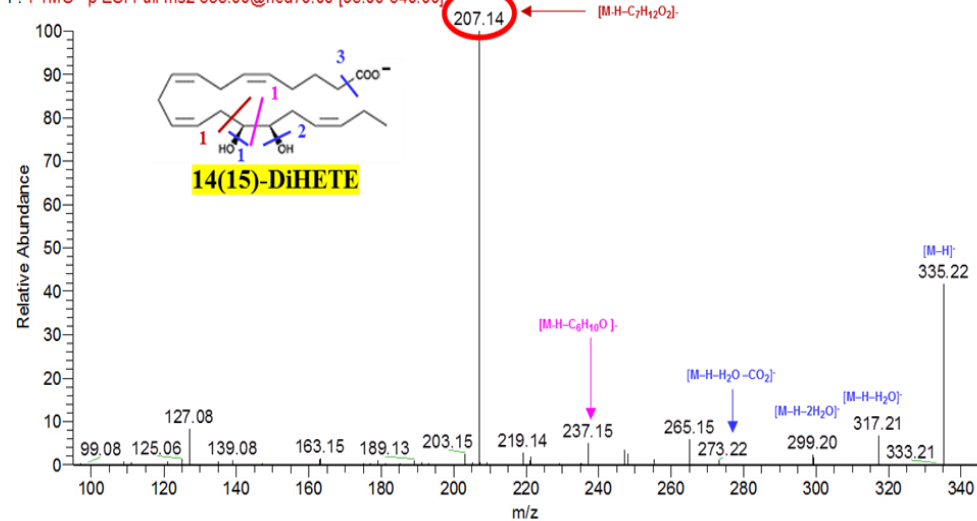
20201112\_LTD4-1 #6-35 RT: 0.05-0.11 AV: 4 NL: 7.02E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 495.00@hcd55.00 [95.00-500.00]



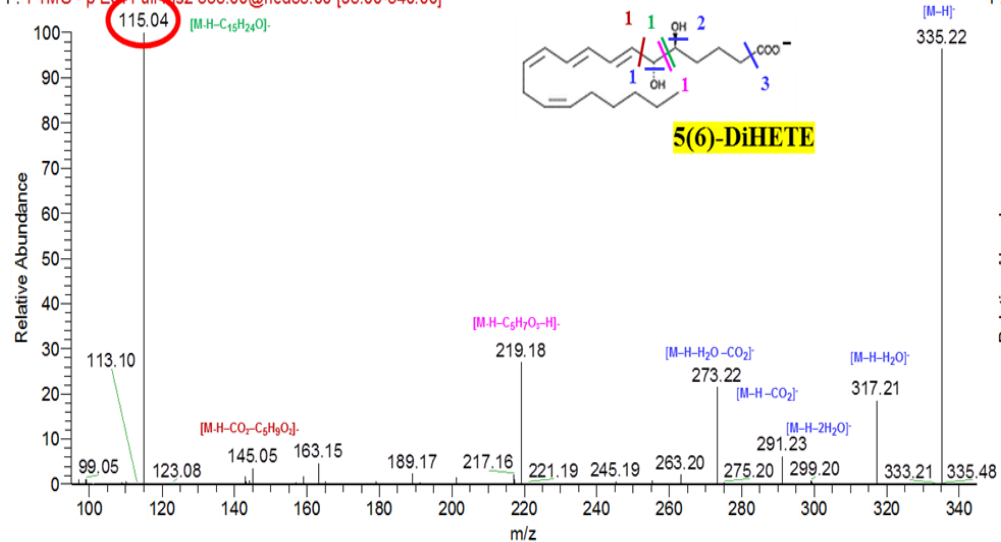
20201112\_LTB4-2 #10-31 RT: 0.06-0.10 AV: 3 NL: 9.97E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 335.00@hcd70.00 [95.00-340.00]



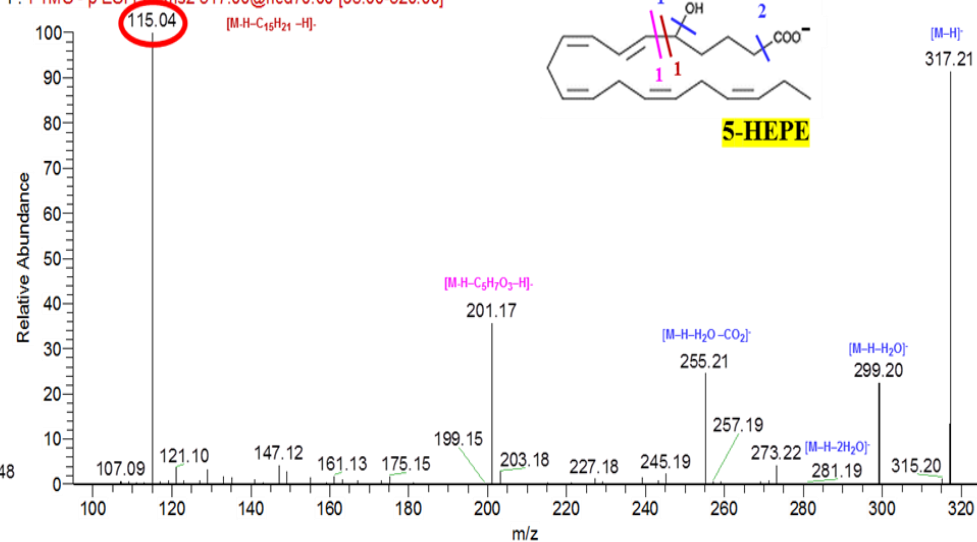
20201112\_14-15-DiHETE-2 #9-47 RT: 0.06-0.14 AV: 5 NL: 2.53E6  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 335.00@hcd70.00 [95.00-340.00]



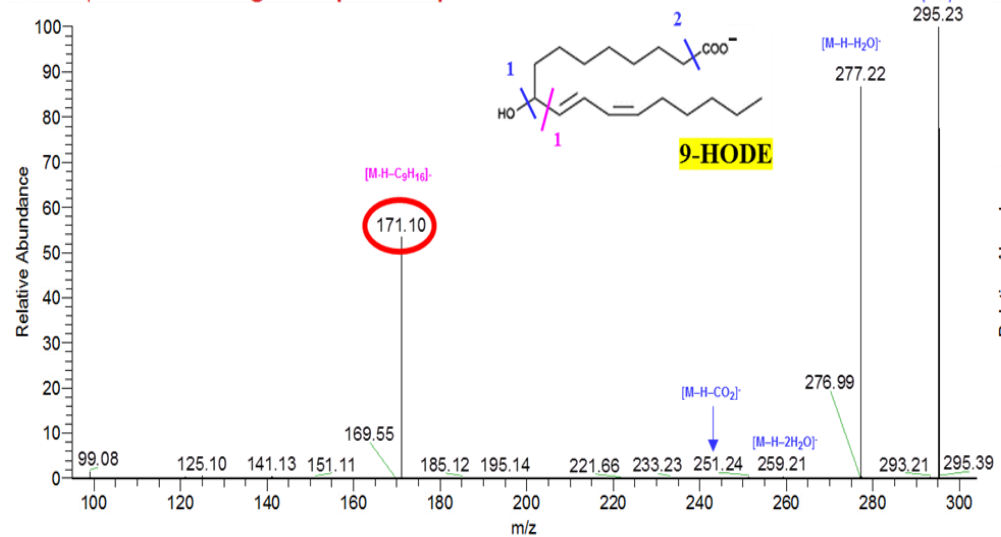
20201112\_5-6-DIHEPE-1 #5-39 RT: 0.05-0.14 AV: 5 NL: 3.73E5  
 F: FTMS - p ESI Full.ms2 335.00@hcd55.00 [95.00-340.00]



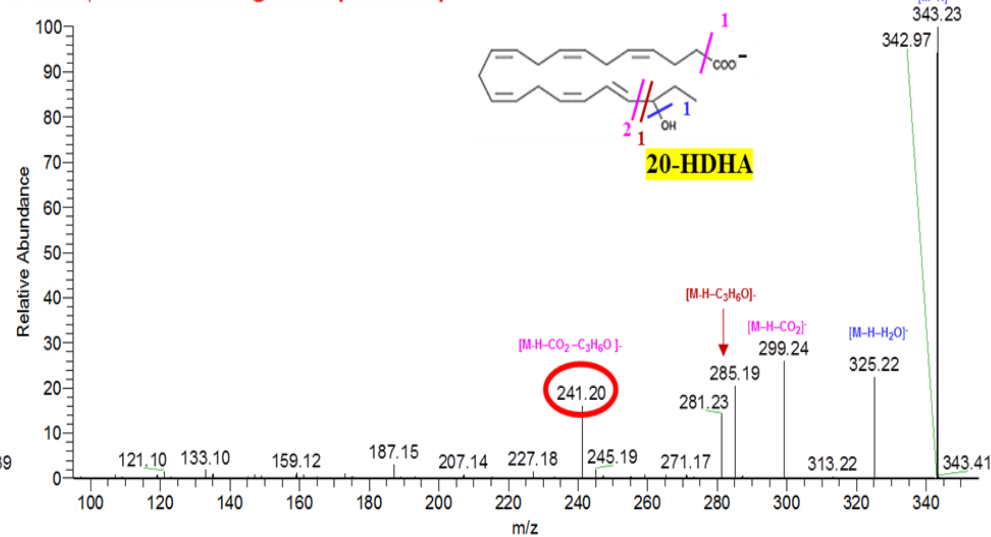
20201112\_5-HEPE-1 #5-37 RT: 0.02-0.12 AV: 5 NL: 1.86E5  
 F: FTMS - p ESI Full.ms2 317.00@hcd70.00 [95.00-320.00]



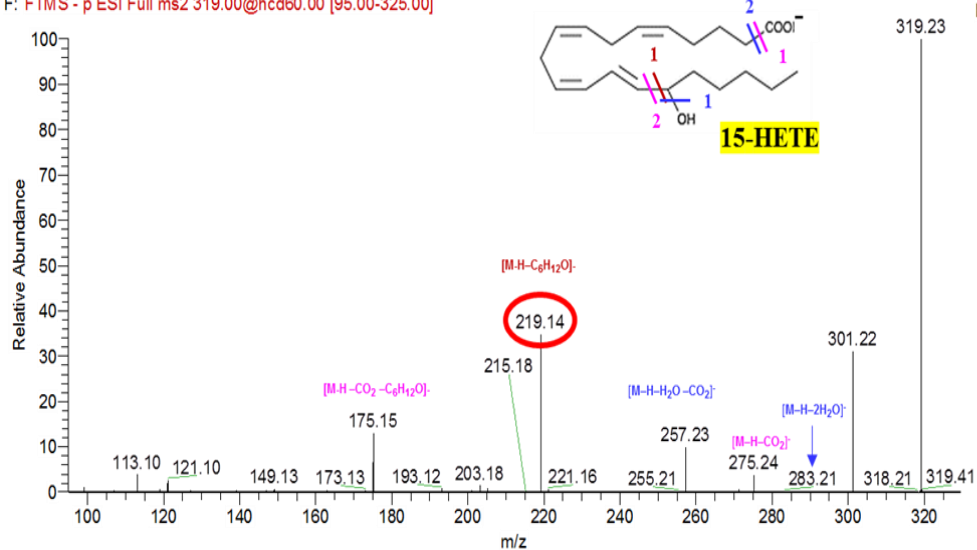
20201112\_9-HODE-1 #7-38 RT: 0.06-0.12 AV: 4 NL: 6.61E5  
 F: FTMS - p ESI Full.ms2 295.00@hcd75.00 [95.00-300.00]



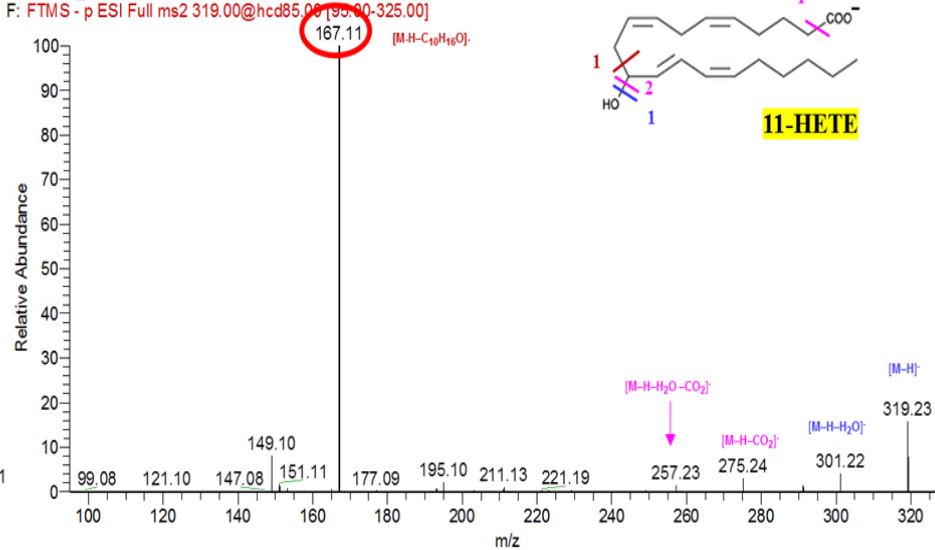
20201112\_20-HDHA-1 #9-42 RT: 0.04-0.12 AV: 5 NL: 1.01E6  
 F: FTMS - p ESI Full.ms2 343.00@hcd55.00 [95.00-350.00]



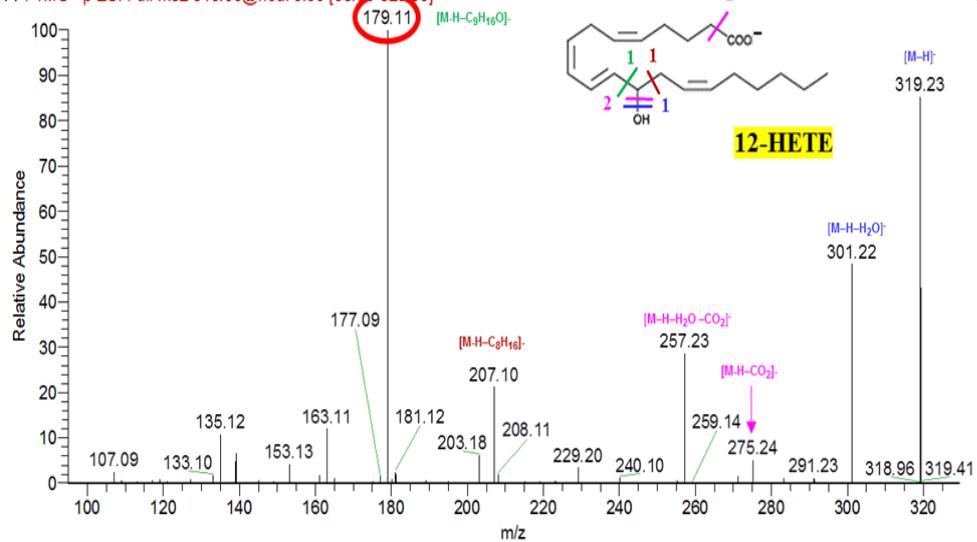
20201112\_15-HETE-1 #7-47 RT: 0.04-0.15 AV: 6 NL: 1.24E6  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 319.00@hcd60.00 [95.00-325.00]



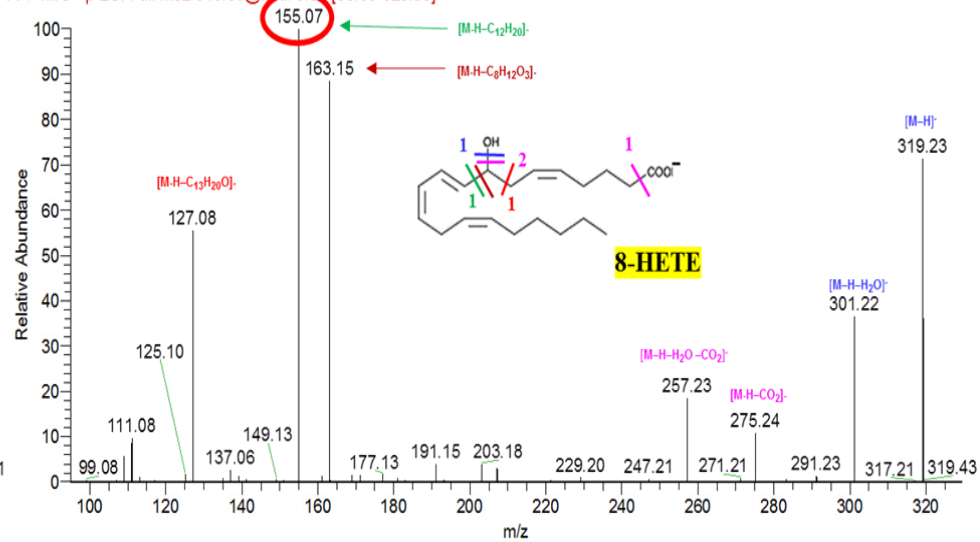
20201112\_11-HETE-2 #8-43 RT: 0.04-0.14 AV: 6 NL: 9.07E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 319.00@hcd85.00 [95.00-325.00]



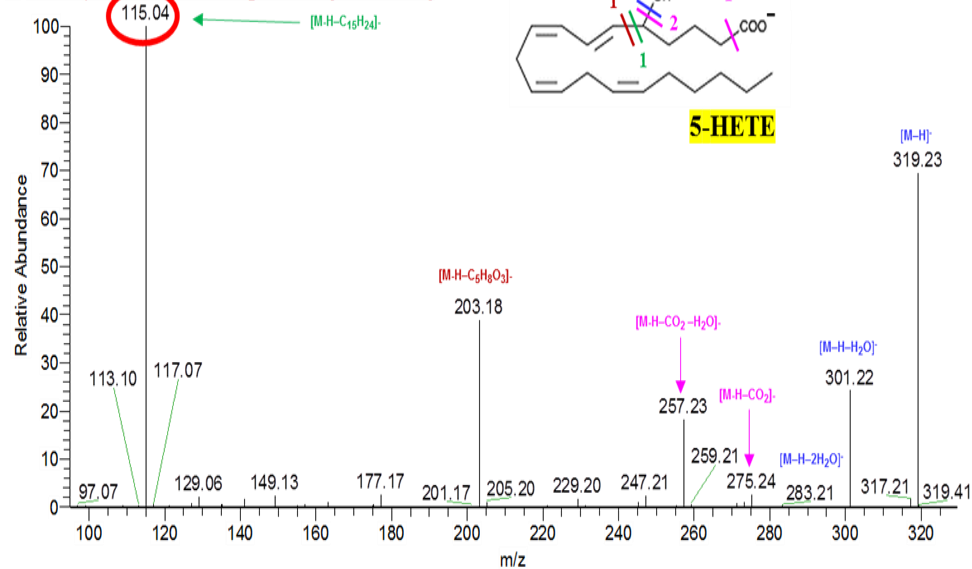
20201112\_12-HETE-1 #5-44 RT: 0.02-0.13 AV: 6 NL: 3.98E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 319.00@hcd70.00 [95.00-325.00]



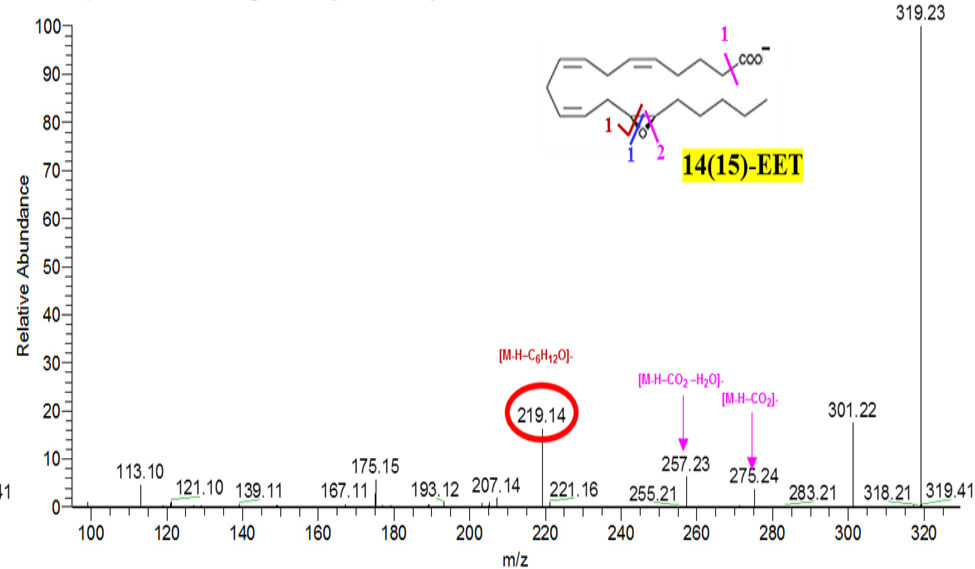
20201112\_8-HETE-1 #7-40 RT: 0.05-0.12 AV: 4 NL: 4.38E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 319.00@hcd75.00 [95.00-325.00]



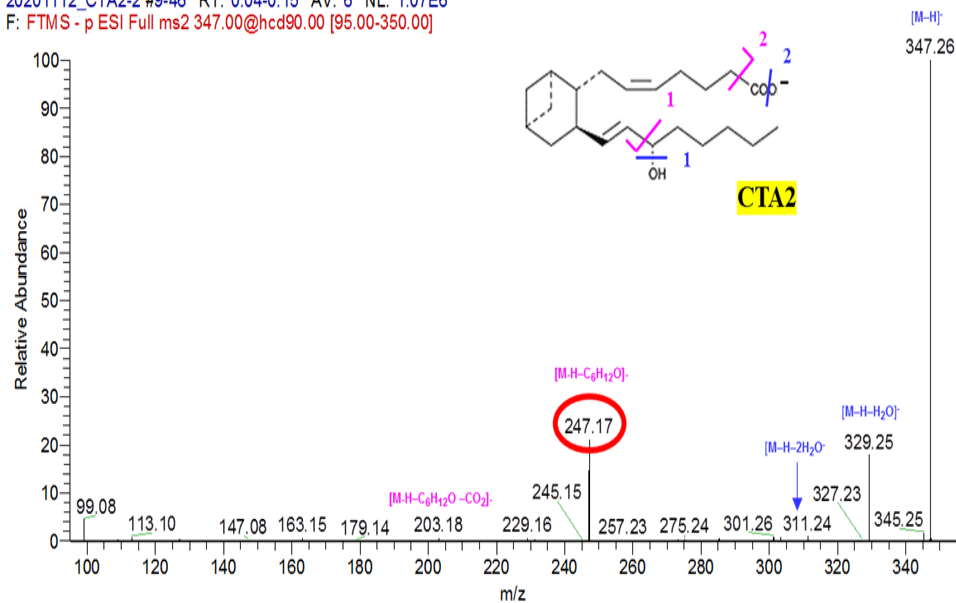
20201112\_5-HETE-1 #6-38 RT: 0.03-0.12 AV: 5 NL: 3.10E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 319.00@hcd75.00 [95.00-325.00]



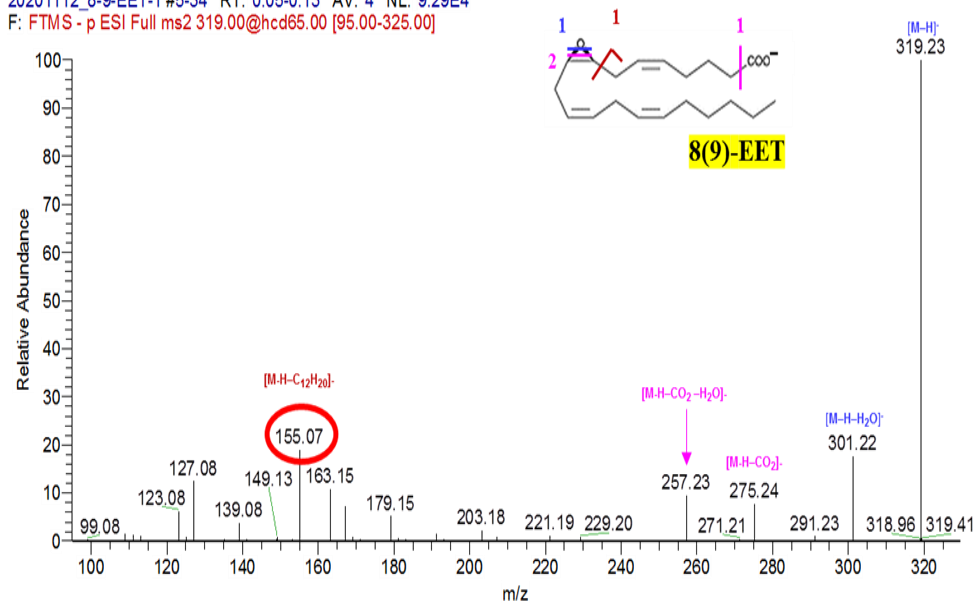
20201112\_14-15-EET-1 #6-33 RT: 0.04-0.13 AV: 4 NL: 1.32E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 319.00@hcd60.00 [95.00-325.00]



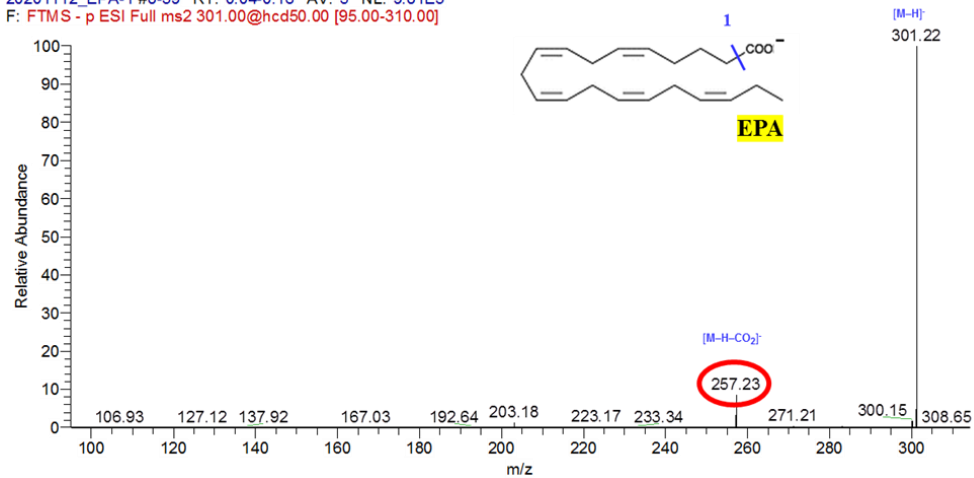
20201112\_CTA2-2 #9-46 RT: 0.04-0.15 AV: 6 NL: 1.07E6  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 347.00@hcd90.00 [95.00-350.00]



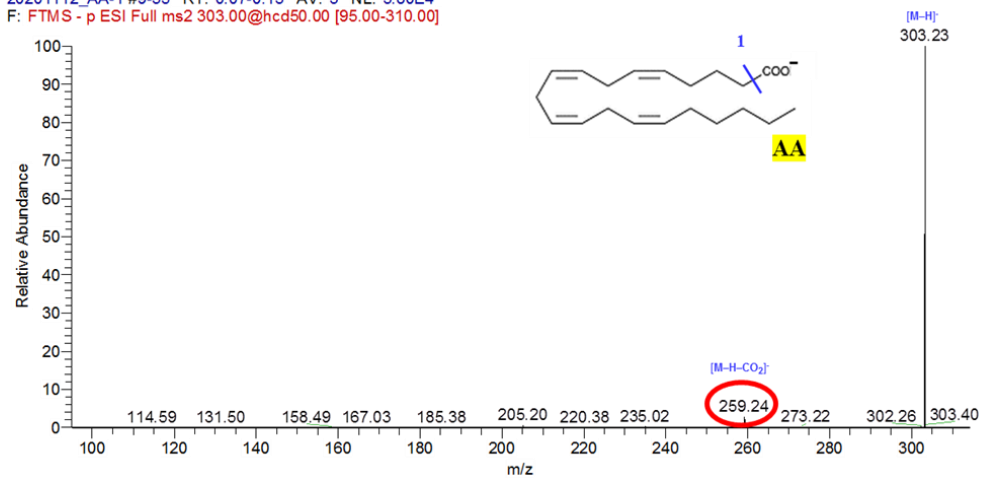
20201112\_8-9-EET-1 #5-34 RT: 0.05-0.13 AV: 4 NL: 9.29E4  
 F: FTMS - p ESI Full ms2 319.00@hcd65.00 [95.00-325.00]



20201112\_EPA-1 #8-39 RT: 0.04-0.16 AV: 5 NL: 9.81E3  
F: FTMS - p ESI Full ms2 301.00@hcd50.00 [95.00-310.00]



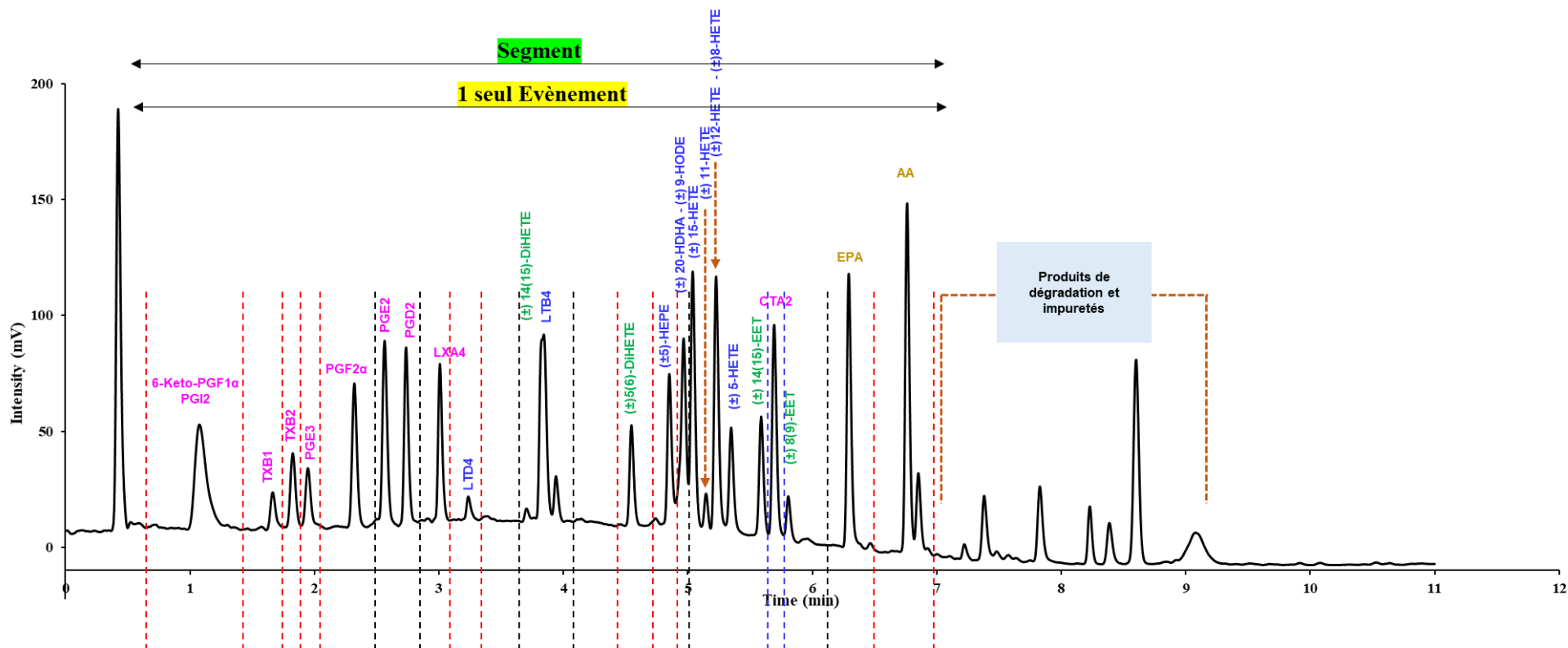
20201112\_AA-1 #9-35 RT: 0.07-0.13 AV: 3 NL: 3.80E4  
F: FTMS - p ESI Full ms2 303.00@hcd50.00 [95.00-310.00]



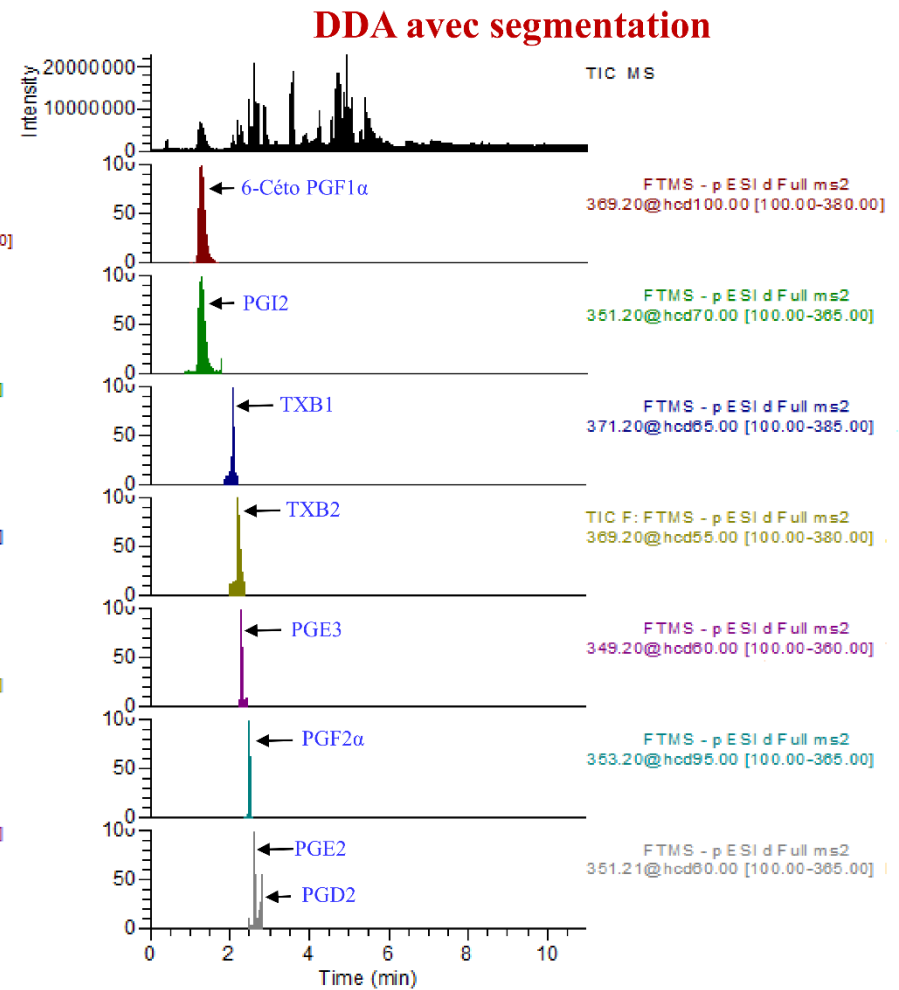
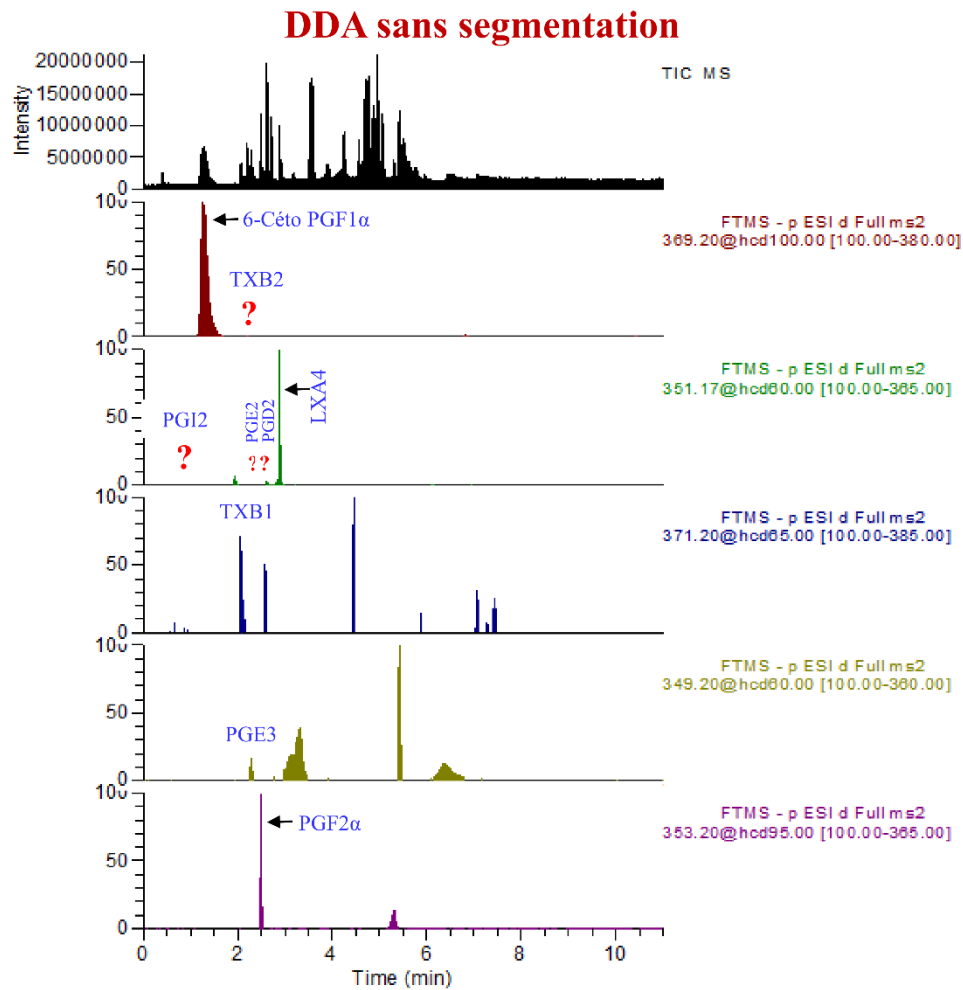
## 5. Illustration de la segmentation du profil chromatographique pour analyse par le LTQ-Orbitrap®

### Velos Pro en mode DDA avec segmentation du profil chromatographique

Un seul évènement permet d'analyser toutes les molécules. La segmentation en question ici consiste à définir des fenêtres d'élution. Chaque fenêtre d'élution correspond à une molécule de  $m/z$  donné ou à un groupe d'isomères ou d'isobares de même  $m/z$ . Cette subdivision des fenêtres d'élution ou « segmentation » réduit aussi le nombre de molécules à suivre en même temps de manière synchrone. Enfin, elle permet ainsi de pouvoir attribuer les énergies spécifiques de fragmentation à chaque molécule.



## 6. Comparaison de l'acquisition en mode DDA sans segmentation et avec segmentation du profil LC par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro)



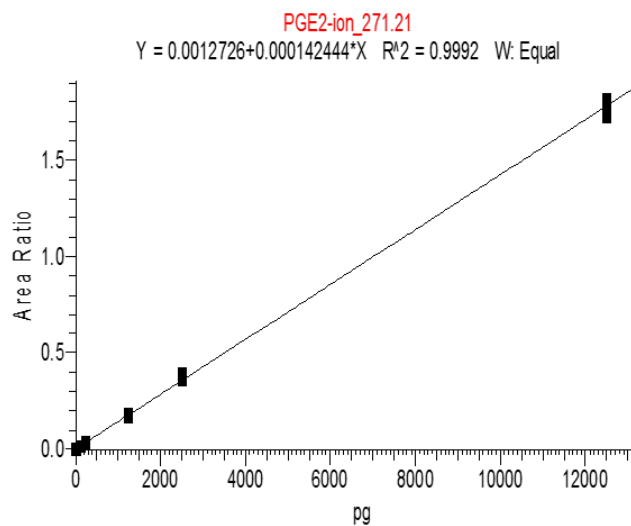
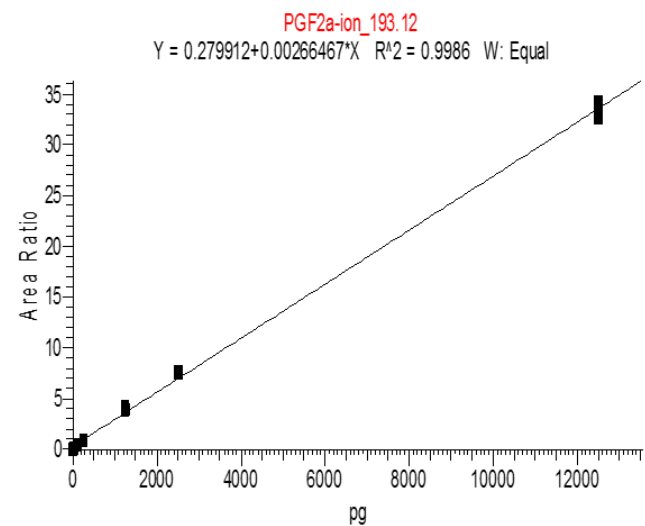
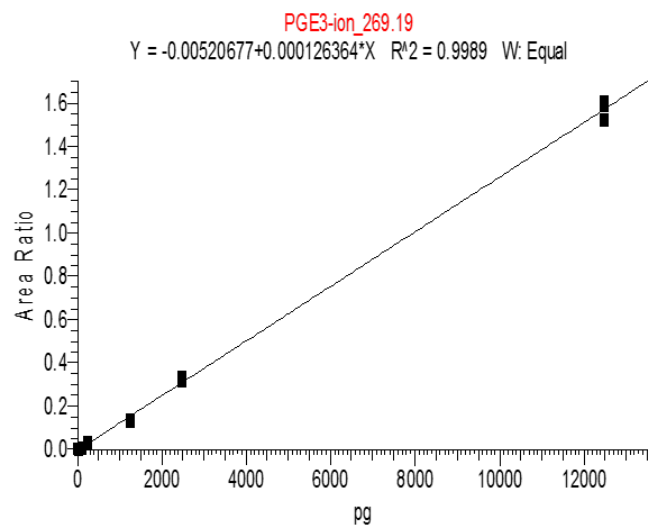
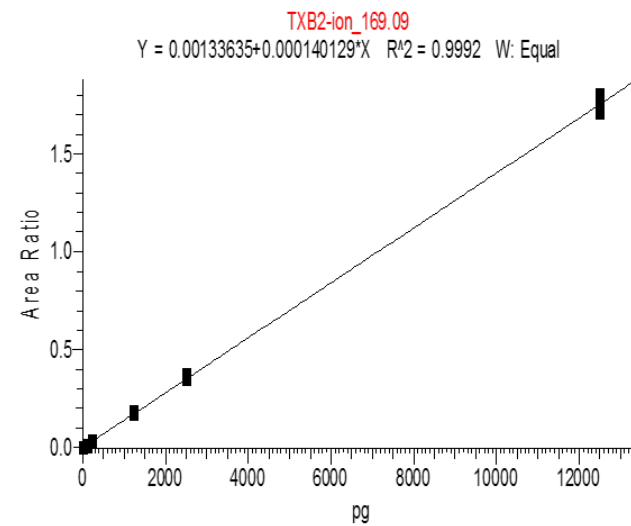
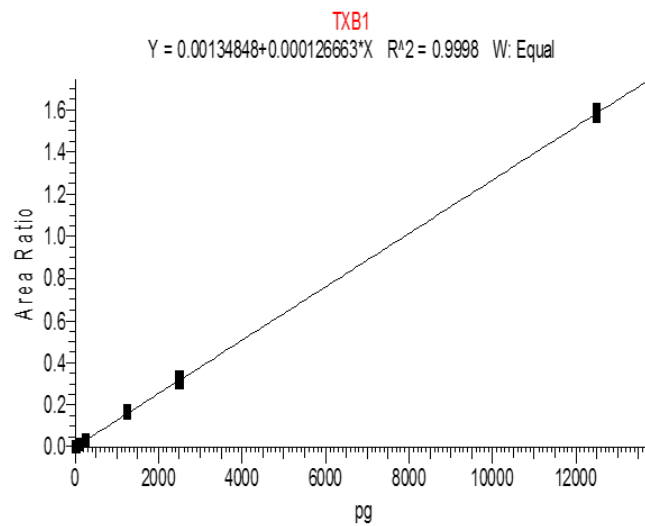
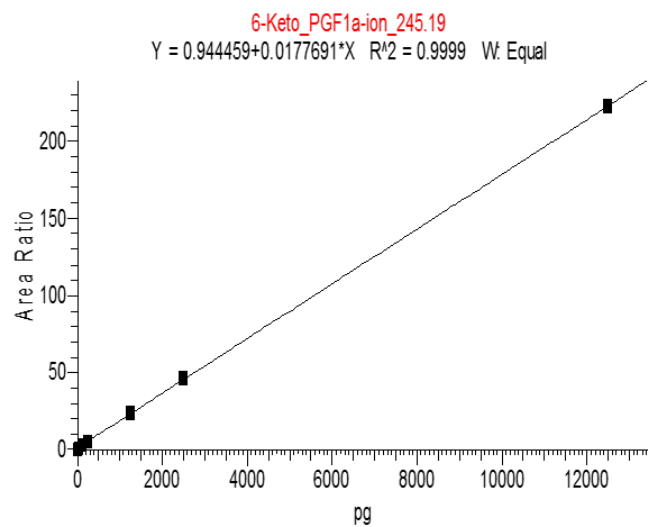
## 7. Evaluation de la sélectivité de la méthode RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro) en mode DDA

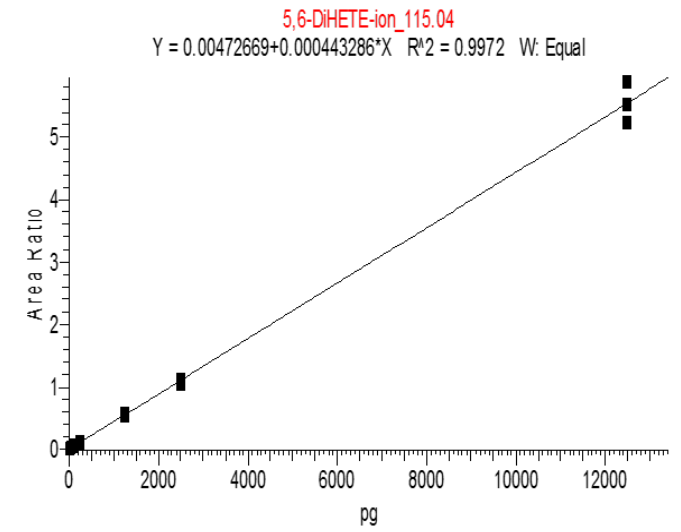
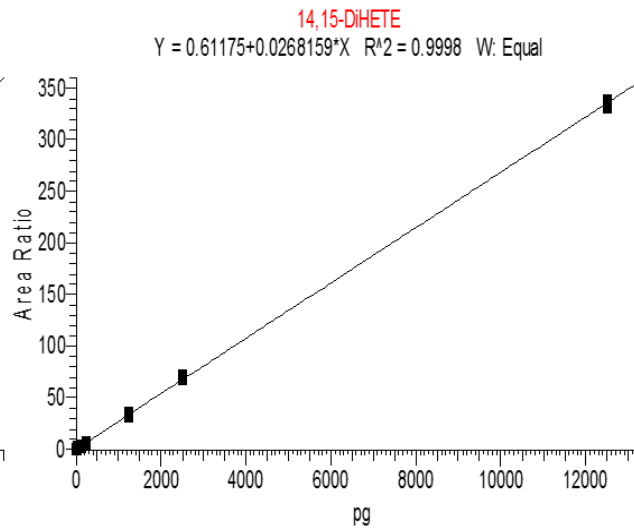
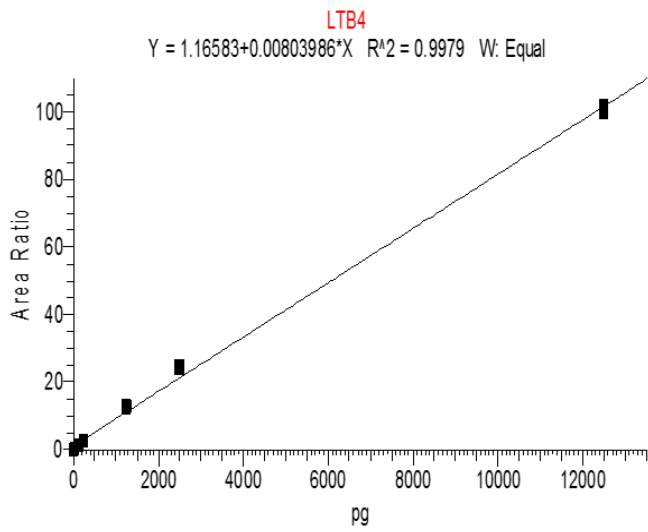
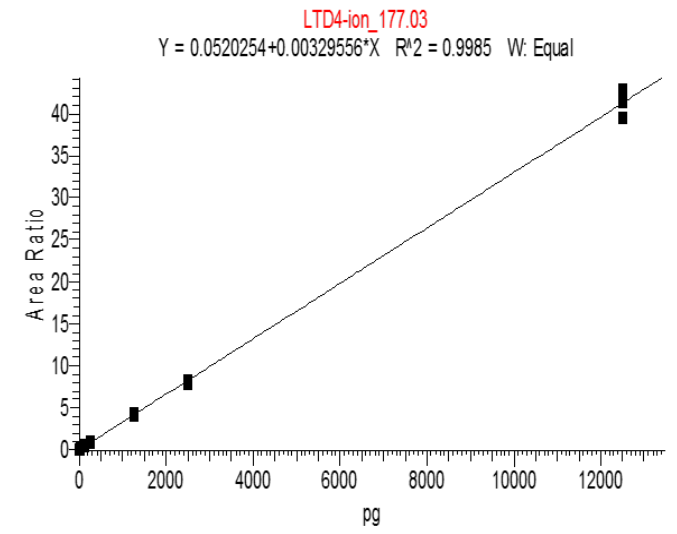
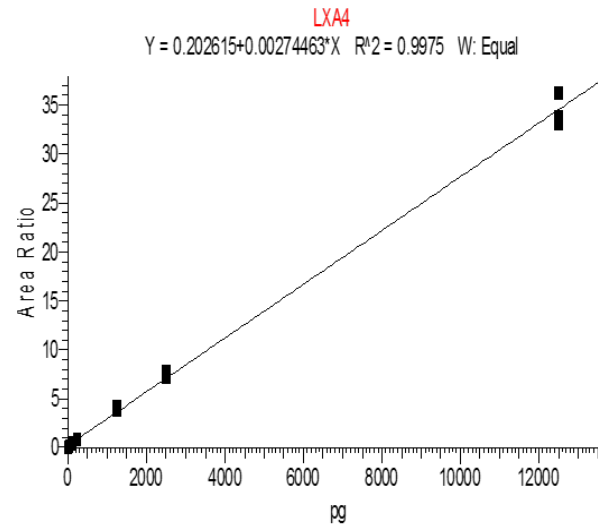
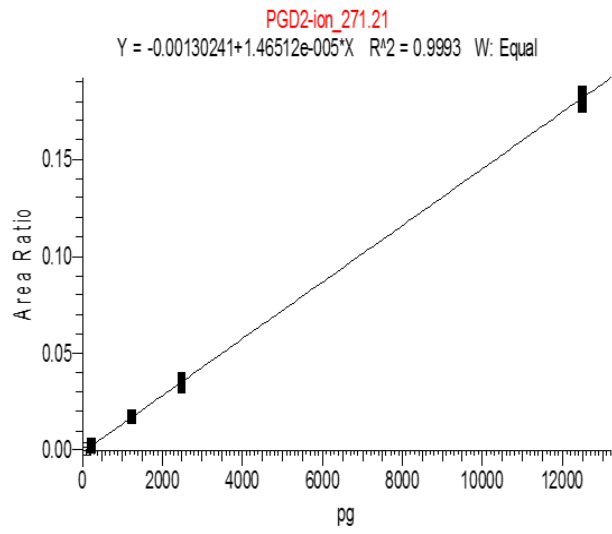
Eicosanoïdes-AGPI	Ion de quantification / Ion de qualification	Rapport d'ion de quantification / Ion de qualification					Moyenne	Ecart type	CV
		1ère Analyse	2ème Analyse	3ème Analyse	4ème Analyse	5ème Analyse			
<b>6-Céto-PGF1<math>\alpha</math></b>	<b>245.19/163.11</b>	1.25	1.26	1.26	1.26	1.26	1.25	0.0038	0.31
<b>PGI2</b>	143.07/189.13	0.90	0.87	0.91	0.85	0.93	0.89	0.0306	3.43
<b>TXB1</b>	<b>171.10/197.12</b>	1.91	1.91	1.95	1.93	1.92	1.92	0.0159	0.82
<b>TXB2</b>	<b>169.09/195.10</b>	1.48	1.44	1.46	1.46	1.45	1.46	0.0153	1.05
<b>PGE3</b>	<b>269.19/189.13</b>	2.18	1.82	1.82	2.21	1.91	1.99	0.1970	9.91
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	<b>193.12/309.21</b>	0.75	0.76	0.78	0.76	0.77	0.76	0.0110	1.44
<b>PGE2</b>	<b>271.21/315.20</b>	1.53	1.56	1.60	1.60	1.44	1.55	0.0694	4.49
<b>PGD2</b>	<b>271.21/315.20</b>	3.32	3.13	2.58	2.27	3.20	2.90	0.4501	15.52
<b>LXA4</b>	<b>115.04/351.22</b>	0.40	0.36	0.39	0.37	0.43	0.39	0.0271	6.97
<b>LTD4</b>	<b>177.03/495.25</b>	5.23	5.19	5.47	5.33	5.26	5.30	0.1112	2.10
<b>LTB4</b>	<b>195.10/335.22</b>	0.97	0.99	0.99	0.94	0.96	0.97	0.0197	2.02
<b>14,15-DiHETE</b>	<b>207.14/335.22</b>	2.03	1.96	2.02	1.93	1.96	1.98	0.0451	2.28
<b>5S,6R-DiHETE</b>	<b>115.04/335.22</b>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.0013	6.47
<b>5-HEPE</b>	<b>115.04/317.21</b>	0.67	0.71	0.67	0.73	0.73	0.70	0.0321	4.57
<b>9-HODE</b>	<b>171.10/295.23</b>	0.59	0.61	0.60	0.60	0.61	0.60	0.0072	1.20
<b>20-HDHA</b>	<b>241.20/299.24</b>	0.54	0.53	0.54	0.53	0.52	0.53	0.0075	1.41
<b>15-HETE</b>	<b>219.14/319.23</b>	0.21	0.19	0.20	0.21	0.21	0.21	0.0093	4.52
<b>11-HETE</b>	<b>167.11/319.23</b>	2.32	1.99	2.23	1.85	2.69	2.22	0.3244	14.64
<b>12-HETE</b>	<b>179.11/319.23</b>	0.78	0.79	0.65	0.77	0.70	0.74	0.0617	8.37
<b>8-HETE</b>	<b>155.07/319.23</b>	0.49	0.45	0.45	0.41	0.47	0.45	0.0316	6.98
<b>5-HETE</b>	<b>115.03/319.23</b>	1.17	1.14	1.16	1.18	1.10	1.15	0.0314	2.73
<b>14,15-EET</b>	<b>219.14/319.23</b>	0.13	0.13	0.14	0.13	0.13	0.13	0.0016	1.16
<b>CTA2</b>	<b>247.17/347.26</b>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.0014	0.68

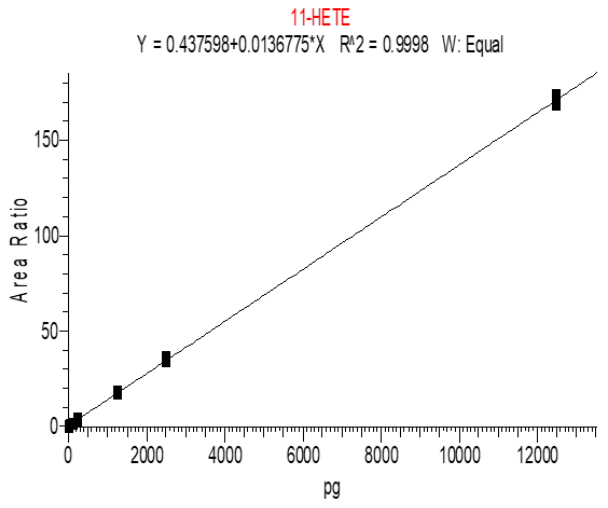
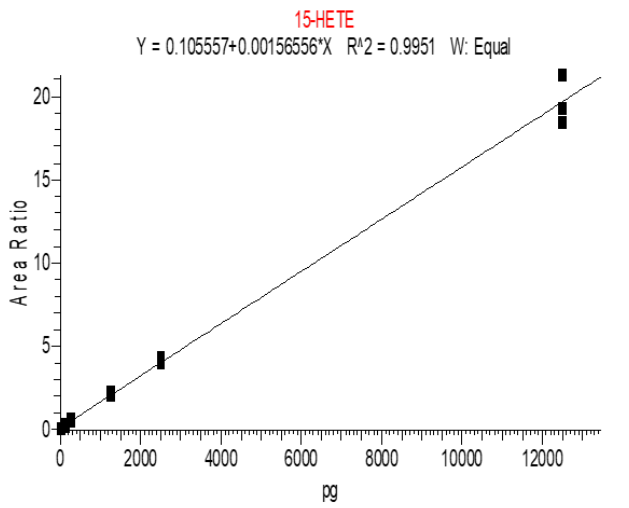
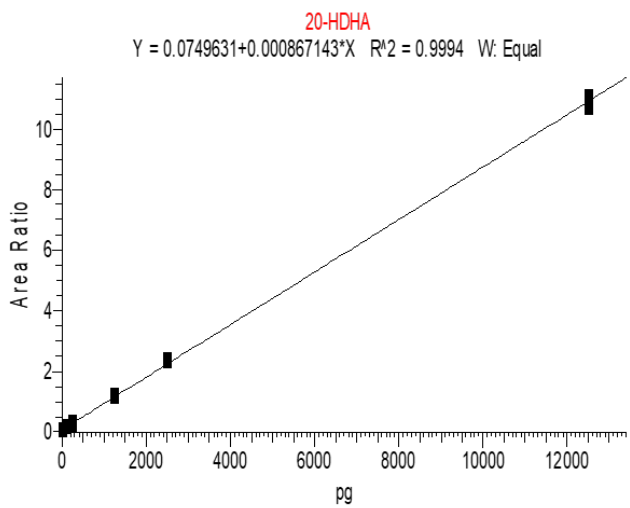
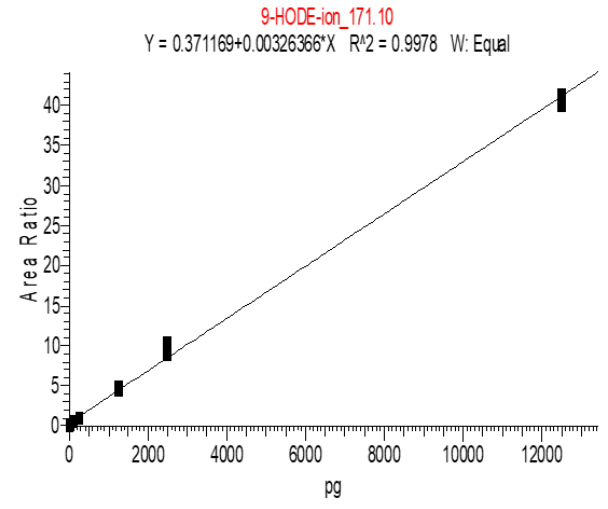
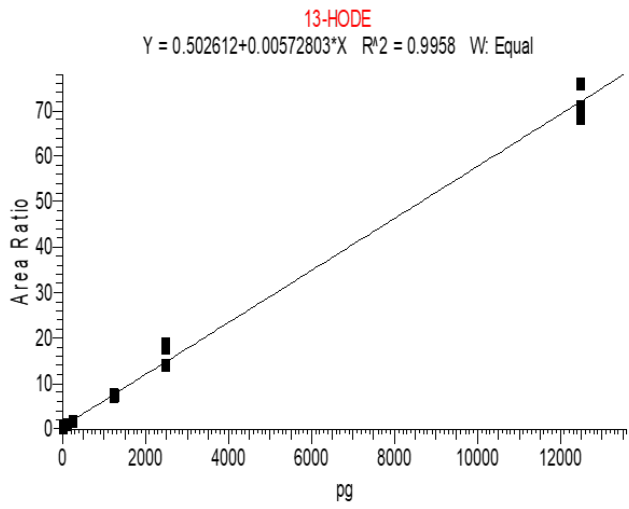
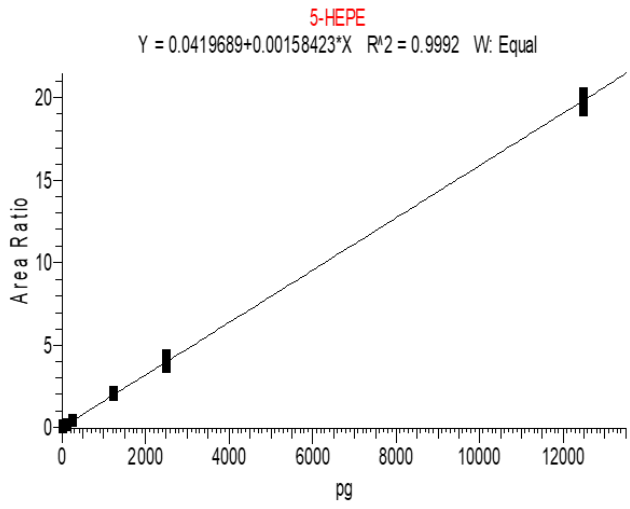


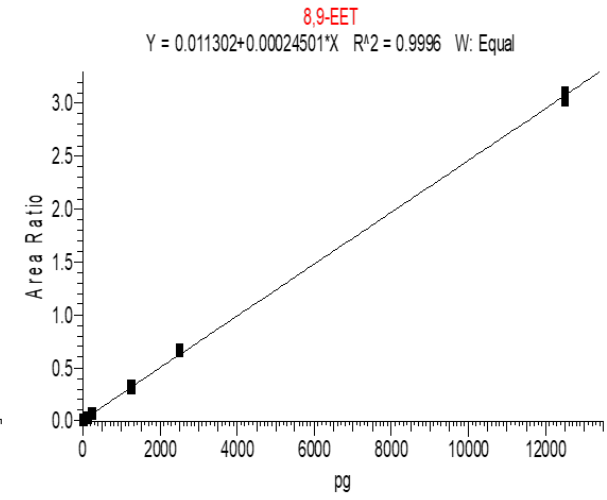
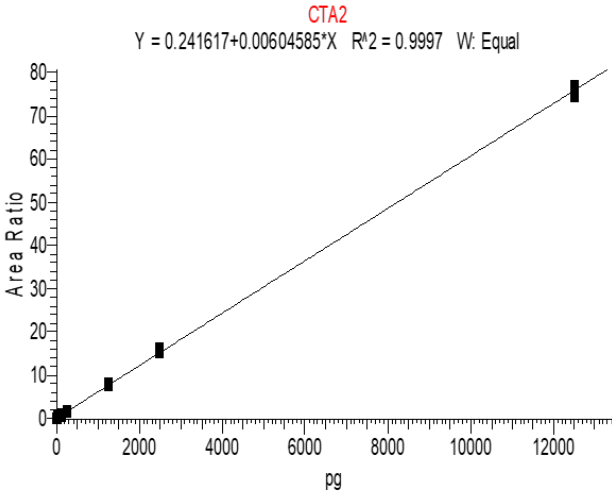
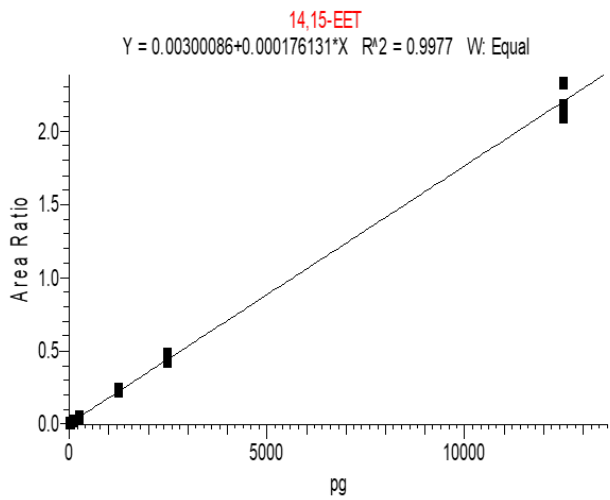
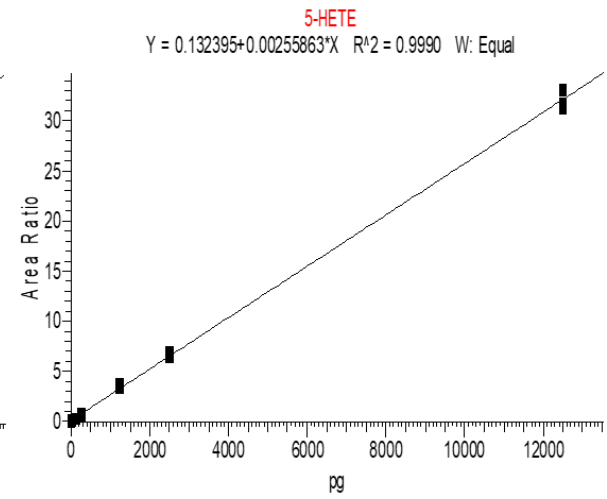
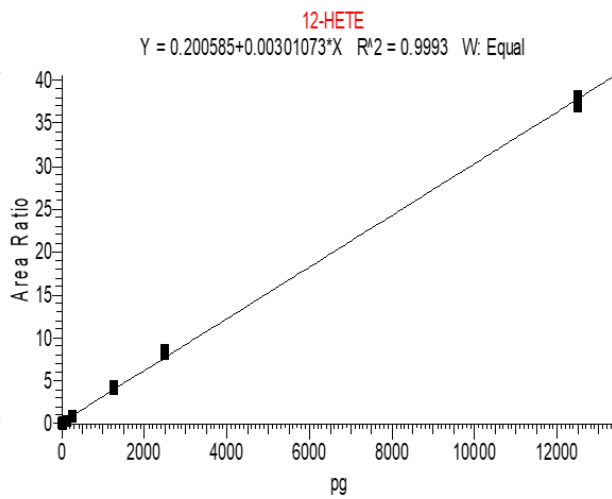
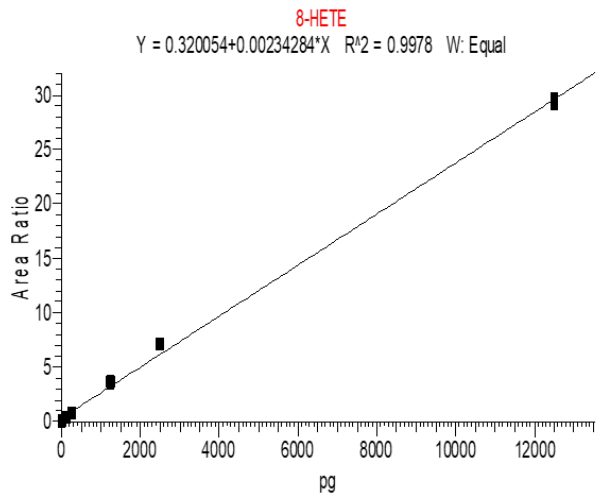
<b>8,9-EET</b>	<b>155.07/319.23</b>	0.34	0.33	0.31	0.33	0.32	0.32	0.0097	2.98
<b>EPA</b>	<b>257.23/301.22</b>	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.0021	3.18
<b>AA</b>	<b>259.24/303.23</b>	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.0008	3.55

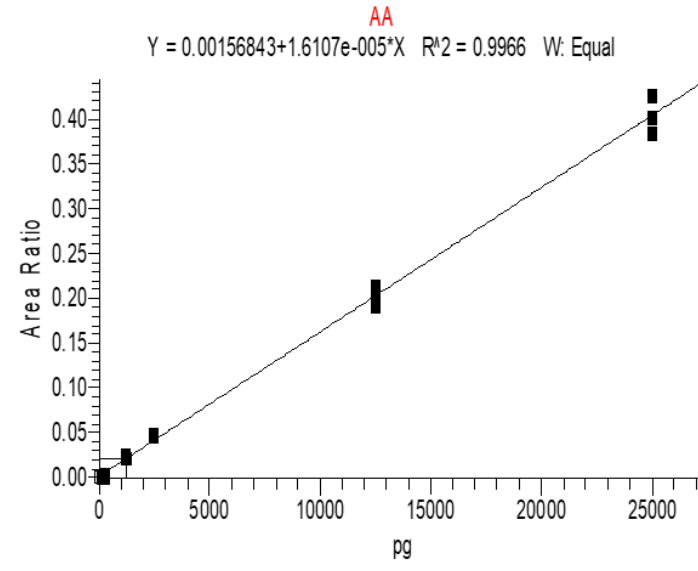
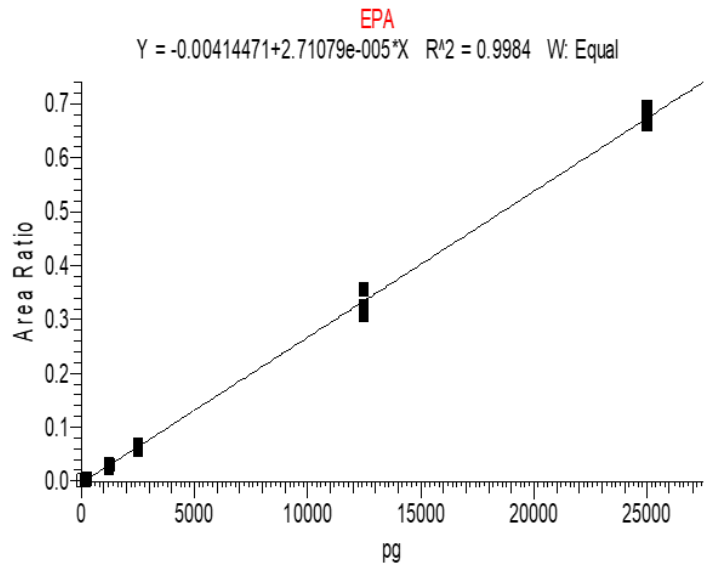
## 8. Courbes d'étalonnage pour la quantification des eicosanoïdes











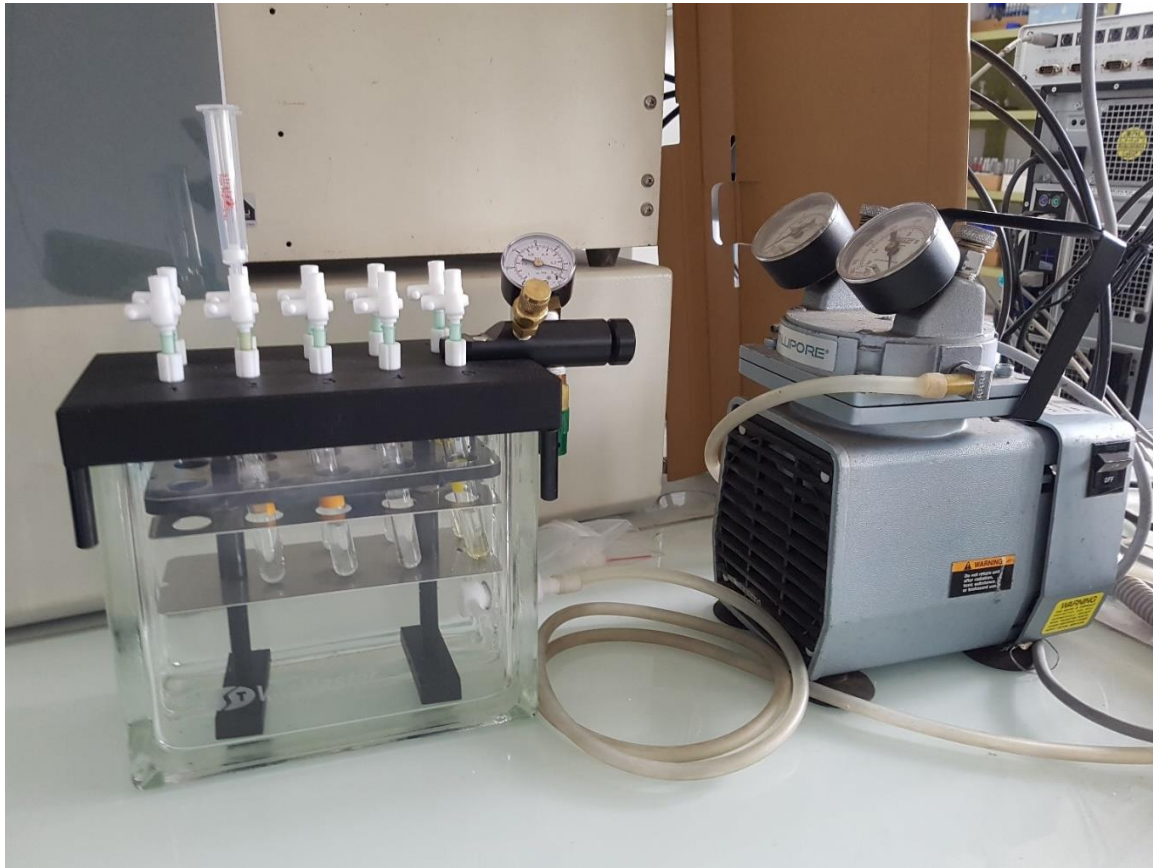
## 9. Paramètres d'optimisation de source, de fragmentation et les transitions sur la LCMS-8060

Compound Name	Precursor m/z	Qarray Bias	m/z1	CE1	Q1 Pre Bias1	Q3 Pre Bias1	Ratio1	m/z2	CE2	Q1 Pre Bias2	Q3 Pre Bias2	Ratio2	m/z3	CE3	Q1 Pre Bias3	Q3 Pre Bias3	Ratio3
6-Keto PGF1a	369.2	20	163.3	25	10	17	87.01	245.1	26	18	49	100	351.05	18	27	15	35.65
PGI2	351.1	-40	271.2	16	13	17	86.23	315.15	13	39	36	100	333.2	12	13	23	69.06
TXB1	371.15	20	171.25	19	10	18	100	197.1	15	27	36	83.27	327.1	11	18	15	29.01
TXB2	369.15	20	169.25	16	10	18	100	195.05	15	41	33	89.68	289.05	16	18	18	14.71
PGE3	349.1	20	269.15	14	13	11	100	313.1	11	39	35	78.38	189.3	17	13	18	41.15
PGF2a	353.15	-80	309.15	18	13	19	100	193.1	24	41	44	69.04	335.25	15	13	35	27.04
PGE2	351.1	0	271.15	17	13	11	100	333.1	11	26	41	81.98	315.1	10	13	14	91.98
PGD2	351.1	20	271.15	18	13	17	100	315.15	13	41	37	97.3	233.3	11	13	15	72.67
LXA4	351.1	-20	235.15	13	13	15	46.6	115.15	16	41	43	100	217.15	19	18	14	73.95
LTD4	495.15	-40	177.2	16	14	11	100	289.3	26	33	33	9.15	143.15	21	19	28	74.55
LTB4	335.1	-80	195.3	14	17	13	100	317.2	14	24	36	74.04	123.2	20	24	20	18.19
14,15-DiHETE	335.1	-80	207.15	16	17	13	100	127.2	16	23	30	9.8	255.2	14	24	11	6.46
6,5-DiHETE	335.1	0	317.35	13	17	50	60.96	145.05	17	37	24	100	189.4	15	17	36	24.51
5-HEPE	317	-20	299.15	9	11	13	100	249.15	8	11	50	55.55	115.15	11	11	22	88.81
9-HODE	295	-40	277.1	15	33	35	100	171.3	15	20	18	51.74	---	---	---	---	---
13-HODE	295.1	20	195.3	17	10	13	63.6	277.2	19	35	28	100	113	22	20	10	9.07
20-HDHA	343	20	281.25	12	13	18	81.31	325.15	11	24	35	100	285.1	10	17	13	50.81
15-HETE	319.1	-60	301.15	13	11	14	100	219.35	13	37	41	75.46	257.2	12	15	17	79.24
11-HETE	319.1	-80	167.3	14	36	35	100	301.2	12	17	22	10.41					
8-HETE	319.1	-20	301.15	12	15	13	100	155.05	14	36	37	82.85	127.25	20	17	23	11.89
12-HETE	319.1	20	301.1	12	22	28	55.89	179.25	13	23	31	100	257.1	14	15	11	56.85
5-HETE	319.1	20	301.15	11	22	19	100	257.2	14	36	35	87.27	115	13	11	10	78.59
14,15-EET	319	20	219.15	11	11	13	55.69	257.2	12	35	49	69.86	301.1	10	23	20	100
11,12-EET	319	-40	167.1	12	15	10	100	179.2	10	39	35	64.04	301.05	11	23	33	63.32
CTA2	347.2	0	247.15	22	13	17	100	329.25	22	26	23	92.18	113	28	13	11	9.86
8,9-EET	319	-60	275.25	13	20	27	70.65	127.05	14	23	46	95.62	179.15	10	39	11	100
EPA	300.9	20	257.2	12	32	31	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AA	303	0	107.1	20	20	22	6.96	259.2	13	15	27	100	---	---	---	---	---
6-Keto PGF1a-D4	373.15	20	211.35	21	14	13	54.85	249.15	23	24	27	95.13	167.35	25	26	18	100
TXB2-D4	373.15	0	173.25	15	14	17	96.86	199.3	14	27	40	100	329.2	10	14	15	23.21
PGE2-D4	355.15	20	275.15	17	13	50	98.03	337.2	11	24	20	95.81	319.1	12	10	14	100
LTB4-D4	339.15	-140	183.2	36	23	19	100	197.3	17	39	41	21.19	119	53	13	23	36.56

15S-HETE-D8	327.05	-20	226.3	12	17	15	92.83	264.25	15	37	49	45.82	309.25	13	11	10	100
8,9-EET-D11	330.8	-20	313.05	12	36	35	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

## IV. Développement d'une méthode d'extraction par SPE

### 1. Module VacMaster-10 utilisé dans l'étude





## 2. Tableau récapitulatif de l'optimisation de trois facteurs qui influencent le rendement d'extraction

MCI = Milieu de culture incomplet

Numéro	Optimisation de la phase mobile de lavage		Optimisation de la phase mobile d'élution	
	Étapes	Volume (mL)+solvant	Étapes	Volume (mL)+solvant
1	Activation-Equilibration	2mL MeOH + 2mL Eau	Activation-Equilibration	2mL MeOH + 2mL Eau
2	Chargement	1mL (900µL DE MCI +100µL de mélange eicosanoides +AGPI (100ng/mL))	Chargement	1mL (900µL DE MCI +100µL de mélange eicosanoides +AGPI (100ng/mL))
3	Lavage L1	1mL Eau (100,v)	Lavage L1	1mL Eau (100,v)
	Lavage L2	1mL Eau-MeOH(90:10,v/v)		
	Lavage L3	1mL Eau-MeOH(80:20,v/v)		
	Lavage L4	1mL Eau-MeOH(70:30,v/v)		
4	Elution	2mL MeOH	Elution E1	2mL MeOH (100,v)
			Elution E2	2mL ACN(100,v)
			Elution E3	2mL ACN-MeOH(50:50,v/v)
			Elution E4	2mL ACN-H <sub>2</sub> O(90:10,v/v)
			Elution E5	2mL MeOH-H <sub>2</sub> O(90:10,v/v)
			Elution E6	2mL ACN-MeOH-H <sub>2</sub> O(70:25:5,v/v/v)

### 3. Rendements réels par molécule et par cartouche suivant leur protocole optimisé

Molécules	Concentration (ng/mL)	Bond Elut C18		Bond Elut C18- OH		Diazem		Supelclean™ LC-18		Strata C18-E		Oasis® HLB		Strata™-X	
		R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
<b>6-Céto-PGF1<math>\alpha</math></b>	100	99.78	6.40	99.67	1.37	82.94	1.15	94.24	4.94	93.15	3.68	99.54	3.95	108.15	2.93
<b>TXB2</b>	100	109.90	9.97	82.09	6.26	84.54	2.80	92.34	10.47	91.97	5.35	95.04	5.34	103.22	15.59
<b>PGE3</b>	100	102.17	1.73	97.44	3.97	87.14	2.14	93.35	2.73	88.49	2.61	96.03	7.70	104.42	2.27
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	100	102.25	6.36	100.70	1.47	87.19	1.64	89.35	6.76	90.80	2.34	99.97	5.23	104.18	0.30
<b>PGE2</b>	100	99.41	9.67	100.76	3.41	84.12	1.74	82.98	7.99	90.45	5.33	88.92	4.30	98.90	0.88
<b>LXA4</b>	100	100.56	8.86	94.49	0.70	84.53	1.15	89.48	11.73	83.12	6.06	88.16	10.24	102.67	0.76
<b>LTD4</b>	100	86.21	8.21	85.11	8.37	83.09	4.87	50.74	11.57	78.85	6.20	87.47	2.54	92.61	3.10
<b>LTB4</b>	100	97.36	3.85	95.18	3.16	86.27	2.71	85.80	4.00	87.16	1.73	91.88	2.34	98.78	5.05
<b>14,15-DiHETE</b>	100	98.06	4.87	97.68	3.40	87.66	0.68	85.84	6.80	90.48	1.63	91.97	4.07	97.54	1.69
<b>5,6-DiHETE</b>	100	94.41	3.46	88.24	4.95	87.84	2.21	76.73	9.48	87.13	2.70	87.07	7.00	96.86	1.30
<b>5-HEPE</b>	100	94.60	3.52	88.04	8.22	86.94	1.06	80.99	10.66	85.48	5.59	91.32	4.93	98.85	0.66
<b>13-HODE</b>	100	92.12	6.44	89.63	2.58	81.33	0.97	77.06	7.58	84.16	1.64	86.80	2.35	94.99	2.21
<b>9-HODE</b>	100	86.70	3.67	90.60	3.98	83.94	0.55	78.18	6.78	83.86	2.79	86.63	2.02	88.73	3.04
<b>20-HDHA</b>	100	87.20	6.30	91.68	1.78	83.25	1.27	77.36	6.26	80.82	5.13	84.51	3.56	91.44	1.21
<b>15-HETE</b>	100	89.50	7.72	93.44	4.28	83.34	5.84	79.84	9.33	71.57	18.46	86.12	5.80	94.14	1.61
<b>11-HETE</b>	100	85.65	4.03	89.05	1.25	87.29	2.81	77.44	5.81	80.07	4.91	81.94	1.29	95.53	2.21
<b>8-HETE</b>	100	85.61	2.67	90.61	2.60	78.23	3.68	74.44	5.44	77.68	5.36	78.13	1.88	81.87	1.04
<b>12-HETE</b>	100	83.74	2.21	90.15	3.10	86.19	2.59	73.26	7.71	76.74	6.08	74.94	1.13	79.84	0.82
<b>5-HETE</b>	100	81.06	0.73	84.81	8.51	78.91	1.21	72.83	4.60	76.88	3.10	75.32	3.98	83.66	2.41
<b>14,15-EET</b>	100	81.72	6.14	86.72	2.74	86.94	4.41	75.50	3.43	81.89	2.38	73.29	2.72	81.29	0.96
<b>CTA2</b>	100	75.78	6.01	85.41	4.51	79.56	4.16	66.74	8.82	71.89	5.86	70.02	2.90	72.27	0.47
<b>8,9-EET</b>	100	89.04	2.64	89.74	2.60	89.36	1.65	73.93	5.45	81.09	3.35	78.51	2.94	93.00	1.93
<b>EPA</b>	100	69.19	9.37	79.39	5.06	77.76	4.28	58.06	11.83	59.26	7.39	62.29	5.68	69.49	3.82
<b>AA</b>	100	45.69	13.94	59.29	6.65	52.37	9.52	44.75	7.52	50.69	7.94	49.44	8.07	50.10	1.27

---

<b>Rendement global en oxylipines sans AGPI</b>	100	91.57	5.19	91.03	3.90	84.65	2.39	78.77	7.30	82.88	4.70	85.43	4.01	93.09	2.36
---	-----	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------

---

#### 4. Evaluation de l'effet de matrice (%) sur le rendement d'extraction présenté en Annexe IV-3

Molécules	Concentration (ng/mL)	Bond Elut C18	Bond Elut C18-OH	Diazem	Supelclean™ LC-18	Strata C18-E	Oasis® HLB	Strata™-X
<b>6-Céto-PGF1<math>\alpha</math></b>	100	-12.22	-14.88	-19.45	-8.34	-5.95	-17.38	-37.74
<b>TXB2</b>	100	-31.28	-18.29	-34.54	-21.94	-13.76	-37.00	-41.75
<b>PGE3</b>	100	-21.84	-23.44	-25.08	-7.79	-14.29	-16.11	-17.48
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	100	-13.49	-15.97	-14.75	-7.39	-4.41	-9.57	-13.25
<b>PGE2</b>	100	-13.99	-18.15	-11.06	7.61	-2.39	-0.34	-7.56
<b>LXA4</b>	100	-20.31	-10.77	-19.08	0.24	2.45	-10.82	-15.32
<b>LTD4</b>	100	-13.40	-8.94	-6.62	-2.83	-8.59	-6.55	-12.07
<b>LTB4</b>	100	-12.22	-11.39	-9.29	-1.68	-2.28	-3.29	-8.50
<b>14,15-DiHETE</b>	100	-7.86	-10.77	-5.60	1.13	-2.21	0.90	-8.36
<b>5,6-DiHETE</b>	100	-16.92	-13.29	-15.70	3.51	-0.77	-11.32	-11.02
<b>5-HEPE</b>	100	-15.80	-12.76	-16.84	1.34	3.22	-10.10	-3.97
<b>13-HODE</b>	100	-10.90	-8.50	-11.21	4.51	-1.69	-2.56	-5.76
<b>9-HODE</b>	100	-9.20	-5.49	-6.84	4.18	0.42	-5.33	-4.61
<b>20-HDHA</b>	100	-8.74	-15.26	-17.01	2.15	7.33	-7.44	-20.58
<b>15-HETE</b>	100	-6.34	-18.28	-16.97	-11.37	9.10	-6.85	-13.47
<b>11-HETE</b>	100	-8.48	-11.03	-7.97	-3.17	-5.18	-3.93	-7.78
<b>8-HETE</b>	100	-7.19	-10.81	-8.71	2.36	0.29	0.37	-6.23
<b>12-HETE</b>	100	-9.80	-10.15	-8.53	-0.17	-2.25	-1.37	-6.11
<b>5-HETE</b>	100	-6.32	-9.16	-6.07	2.38	8.31	-0.72	-9.61
<b>14,15-EET</b>	100	-7.48	-3.60	-10.00	-0.85	-4.27	3.10	-5.95
<b>CTA2</b>	100	-10.08	-13.53	-10.57	-2.10	-4.77	-4.92	-6.63
<b>8,9-EET</b>	100	-15.29	-11.17	-11.19	-0.96	-1.36	-2.89	-7.47
<b>EPA</b>	100	-7.27	-7.33	-19.65	-1.47	-10.18	3.63	-5.75
<b>AA</b>	100	15.83	10.06	-1.09	6.52	-6.24	-3.64	-12.40

## 5. Protocoles d'extraction suivant Folch et Bligh – Dyer modifié

### Protocole modifié suivant Folch [126] :

Suivant le protocole Folch, il faut un mélange chloroforme : méthanol (2 :1, v/v) à ajouter suivant un volume de telle manière à diluer 20 fois l'échantillon. Nous avons adapté le protocole suivant Folch afin de réduire les volumes de solvant utilisés tout en respectant les proportions finales de 8 :4 :3 correspondant respectivement au chloroforme, au méthanol et à l'eau. Le protocole adapté a été effectué comme suit :

NB : Toute la préparation est réalisée sur de la glace et en éteignant la lumière dans le laboratoire

- 1 mL d'un mélange complexe est réalisé en ajoutant 100 mL d'un mélange de standards d'oxylipines à 100 ng/mL à 900 mL de milieu de culture sans sérum de veau fœtal. L'ensemble est ensuite vortexé.
- Sur le mélange complexe (1mL) constitué préalablement dans un tube à hémolyse, ajouter 2 mL de méthanol puis vortexer
- Ajouter ensuite 4 mL de chloroforme puis vortexer
- Pour faciliter la séparation en deux phases, on ajoute 500µL d'eau puis vortexer et laisser pendant 10 minutes au repos
- Centrifuger pendant 10 minutes à 2500 rpm
- Récupérer la phase organique (phase inférieure) à l'aide d'une pipette pasteur et la placer dans un autre tube à hémolyse.

- Evaporer sous flux d'azote la phase organique récupérée
- Reprendre l'extrait sec dans 100 µL de Méthanol

### Protocole modifié suivant Bligh-Dyer [291] :

NB : Toute la préparation est réalisée sur de la glace et en éteignant la lumière dans le laboratoire

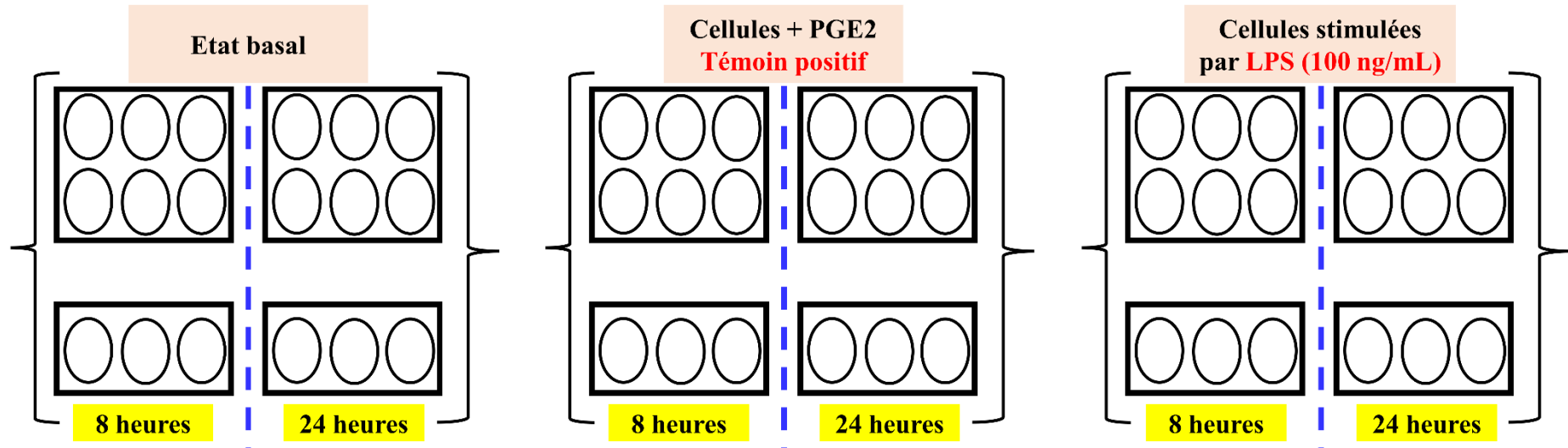
- 1 mL d'un mélange complexe est constitué avec du milieu de culture sans sérum de veau fœtal en y ajoutant 100 ng/mL d'un mélange d'oxylipines de manière à avoir 10% de MeOH dans le volume final.
- Sur le mélange (1mL) constitué préalablement dans un tube à hémolyse, ajouter 2 mL de méthanol puis vortexer
- Ajouter ensuite 1 mL de chloroforme puis bien mélanger
- Ensuite, ajouter 1mL de chloroforme puis 1 mL d'eau pour faciliter la séparation en deux phases
- Vortexer puis laisser au repos pendant 10 minutes
- Centrifuger pendant 10 min à 2500 rpm.
- Récupérer la phase organique (en bas) à l'aide d'une pipette pasteur
- Evaporer cette phase organique sous flux d'azote
- Enfin reprendre l'extrait sec dans 100 µL de méthanol

## 6. Evaluation des performances d'extraction d'eicosanoïdes

Molécules	Concentration (ng/mL)	LLE						SPE		
		Folch			Bligh - Dyer			Strata™-X		
		R (%)	CV(%)	ME (%)	R (%)	CV(%)	ME (%)	R (%)	CV(%)	ME (%)
<b>6-Céto-PGF1<math>\alpha</math></b>	100	15.99	0.80	-13.64	25.61	2.06	-11.50	96.58	1.16	-4.65
<b>TXB2</b>	100	7.45	15.77	-26.38	13.44	3.62	-11.29	94.61	4.02	-14.87
<b>PGE3</b>	100	6.37	5.26	-14.42	17.52	13.72	-13.54	98.32	1.10	-14.16
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	100	10.24	3.39	-8.17	13.96	0.93	-6.77	101.14	1.34	-9.33
<b>PGE2</b>	100	9.84	2.60	-7.78	18.97	0.80	-18.82	99.05	0.23	-16.14
<b>LXA4</b>	100	21.69	1.60	-7.33	23.95	3.01	-6.53	102.60	0.35	-8.29
<b>LTD4</b>	100	11.51	3.62	-7.33	13.25	0.92	-16.50	85.84	0.49	-4.17
<b>LTB4</b>	100	18.48	0.77	-4.85	15.84	0.88	-6.68	92.01	1.82	-7.40
<b>14,15-DiHETE</b>	100	33.27	4.46	-11.65	36.80	1.80	-4.96	101.00	1.67	-2.86
<b>5,6-DiHETE</b>	100	27.23	1.70	-5.07	28.03	2.97	-5.63	96.94	0.62	-3.43
<b>5-HEPE</b>	100	48.00	4.75	-6.34	44.50	2.14	-2.33	96.87	1.87	-4.41
<b>13-HODE</b>	100	51.02	3.34	-10.01	43.13	2.60	-12.24	94.64	2.12	-16.82
<b>9-HODE</b>	100	48.52	1.97	-17.30	45.10	1.34	-25.42	91.01	0.23	-19.61
<b>20-HDHA</b>	100	42.20	3.26	-16.36	45.32	4.50	-12.55	92.20	1.08	-8.69
<b>15-HETE</b>	100	36.75	4.94	-2.68	32.06	5.30	-4.34	96.90	1.32	-8.43
<b>11-HETE</b>	100	32.73	2.19	-6.28	26.28	1.88	-13.61	98.17	1.56	-6.40
<b>8-HETE</b>	100	30.79	0.57	-6.56	23.18	2.93	-11.47	88.70	1.06	-5.21
<b>12-HETE</b>	100	32.17	0.75	-5.61	25.88	2.80	-5.79	84.97	1.33	-6.45
<b>5-HETE</b>	100	32.47	1.28	-1.23	23.88	1.14	-3.28	79.03	1.36	-4.91
<b>14,15-EET</b>	100	41.28	5.98	-9.61	33.91	3.73	-5.80	87.50	0.60	-8.56
<b>CTA2</b>	100	35.56	0.78	-7.95	30.11	1.63	-6.72	85.09	0.55	-11.29
<b>8,9-EET</b>	100	45.25	6.74	-11.70	37.98	0.94	-19.93	88.60	3.83	-7.09
<b>EPA</b>	100	47.80	2.59	-16.59	48.77	3.63	-12.28	55.63	1.15	-10.24
<b>AA</b>	100	57.47	0.22	-6.91	45.40	6.21	-3.43	58.24	2.77	-1.65
<b>Rendement global en oxylipines sans AGPI</b>	100	29.04	3.48	-9.47	28.12	2.80	-10.26	93.26	1.35	-8.78

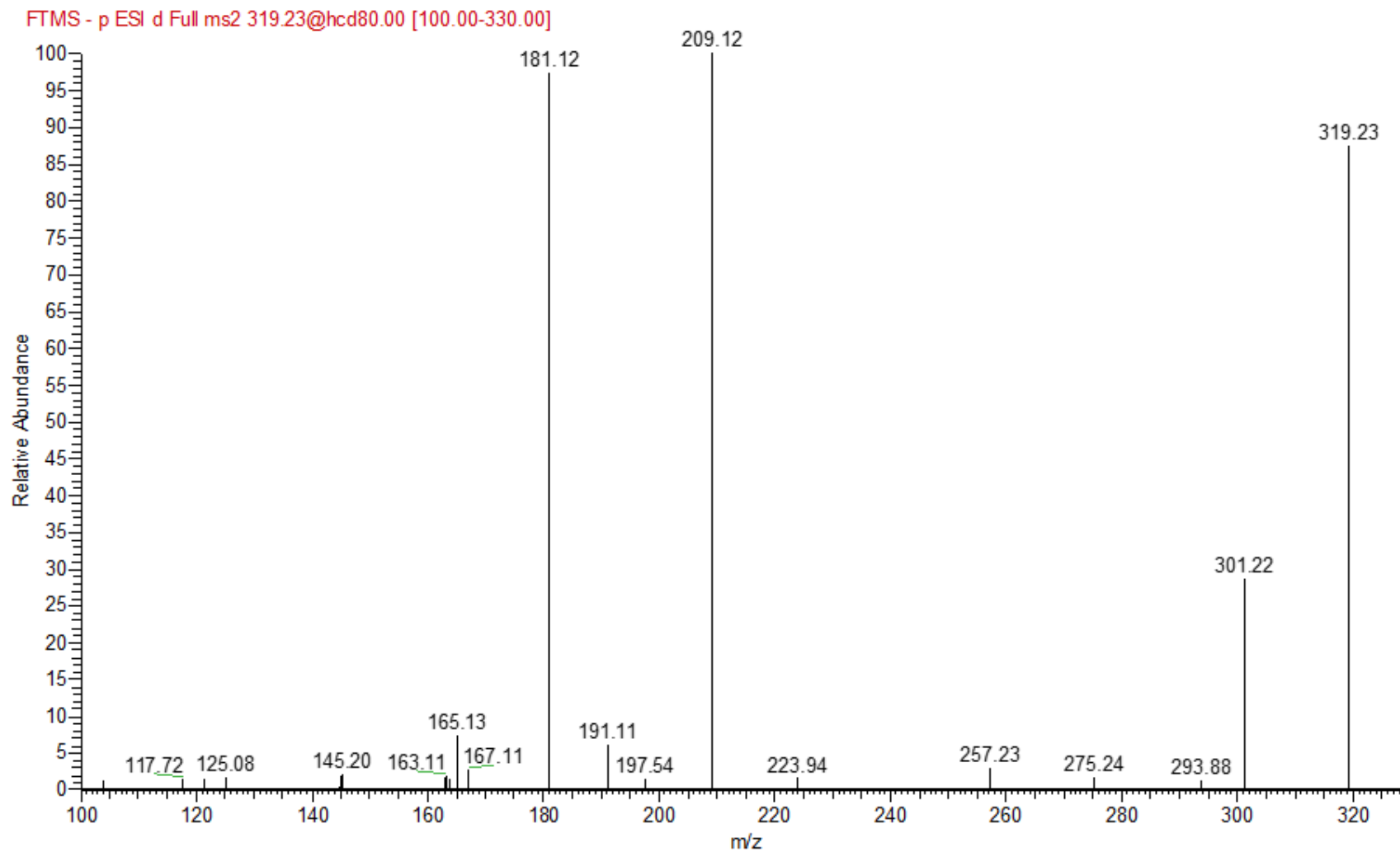
## V. Applications des méthodes développées sur des modèles cellulaires

### 1. Plan de plaque pour l'expérience de stimulation des cellules pour un profilage en eicosanoïdes



## 2. Spectre de fragmentation de la molécule inconnue de m/z de 319.23 produit par les deux lignées de macrophages

Le spectres a été acquis à une résolution de 7500.



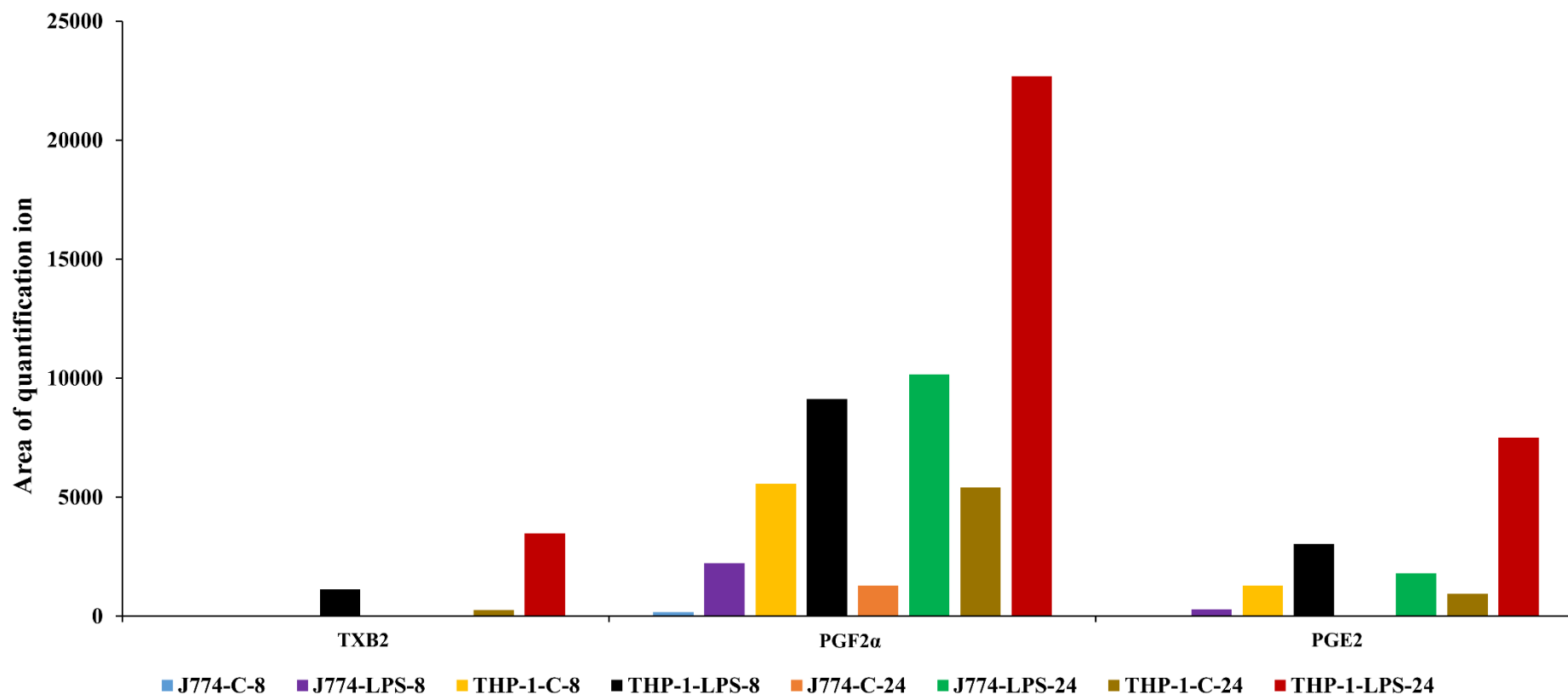


### 3. Récapitulatif des eicosanoïdes cellulaires et exactitude sur leur masse moléculaire

Tr	Molécule identifiée	Formule brute	Masse moléculaire m/z [M-H]	Exactitude en masse (ppm)
2.04	TXB2	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	369.23	1.105
2.38	PGF2 $\alpha$	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	353.23	3.305
2.52	PGE2	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	351.21	2.183
2.74	LXA4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	351.22	3.01
2.93	LTD4	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	495.22	5.716
3.48	LTB4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	335.22	2.096
3.56	14,15-DiHETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	335.22	5.383
4.57	13-HODE	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	295.23	3.117
4.59	9-HODE	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	295.23	3.524
4.62	Inconnue	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	319.23	2.319
4.75	15-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	319.23	1.943
4.8	11-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	319.23	3.259
4.9	12-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	319.23	2.225
5.02	5-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	319.23	2.413
6.43	AA	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	303.23	1.071

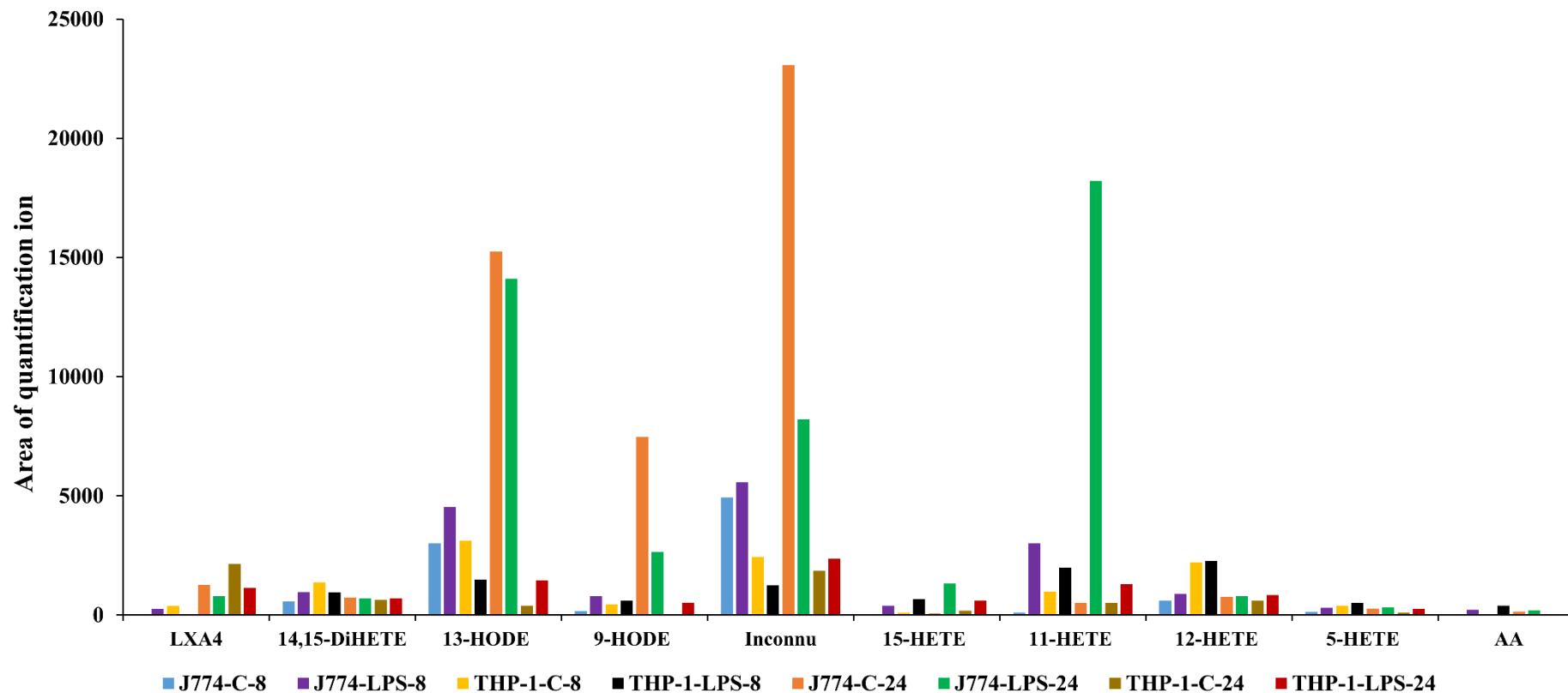
#### 4. Profilage global en prostanoïdes des macrophages J774 et THP-1 stimulés ou non par le LPS (Analyse par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro)).

Pour toutes les conditions, C correspond à l'état basal, LPS correspond à l'état stimulé, le dernier chiffre (8-24) sont les temps d'incubation et/ ou de stimulation. Les échantillons sont ensuite analysés après extraction par RP-HPLC-MS/MS (Orbitrap® Velos Pro). Phase stationnaire : Accucore™ C30 ; Phase mobile : A (Eau: ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 5µL ; Débit = 0,5mL/min

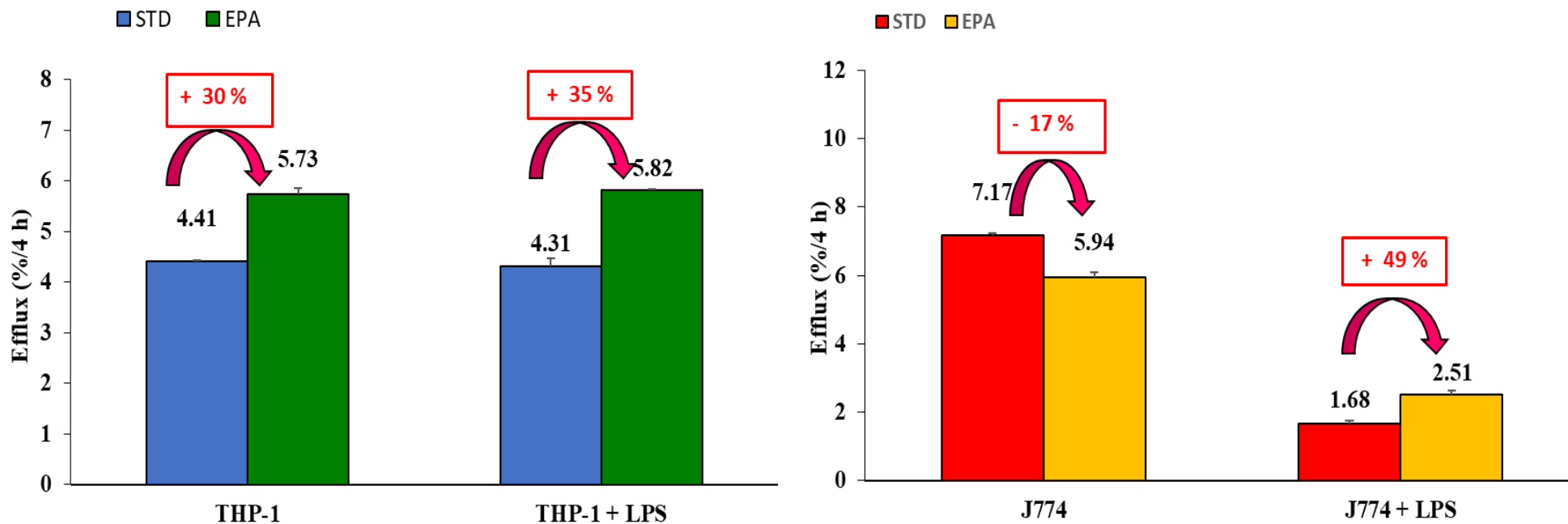


## 5. Profilage des espèces oxydées des macrophages J774 et THP-1 stimulés ou non par le LPS (Analyse par RP-HPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap® Velos Pro)).

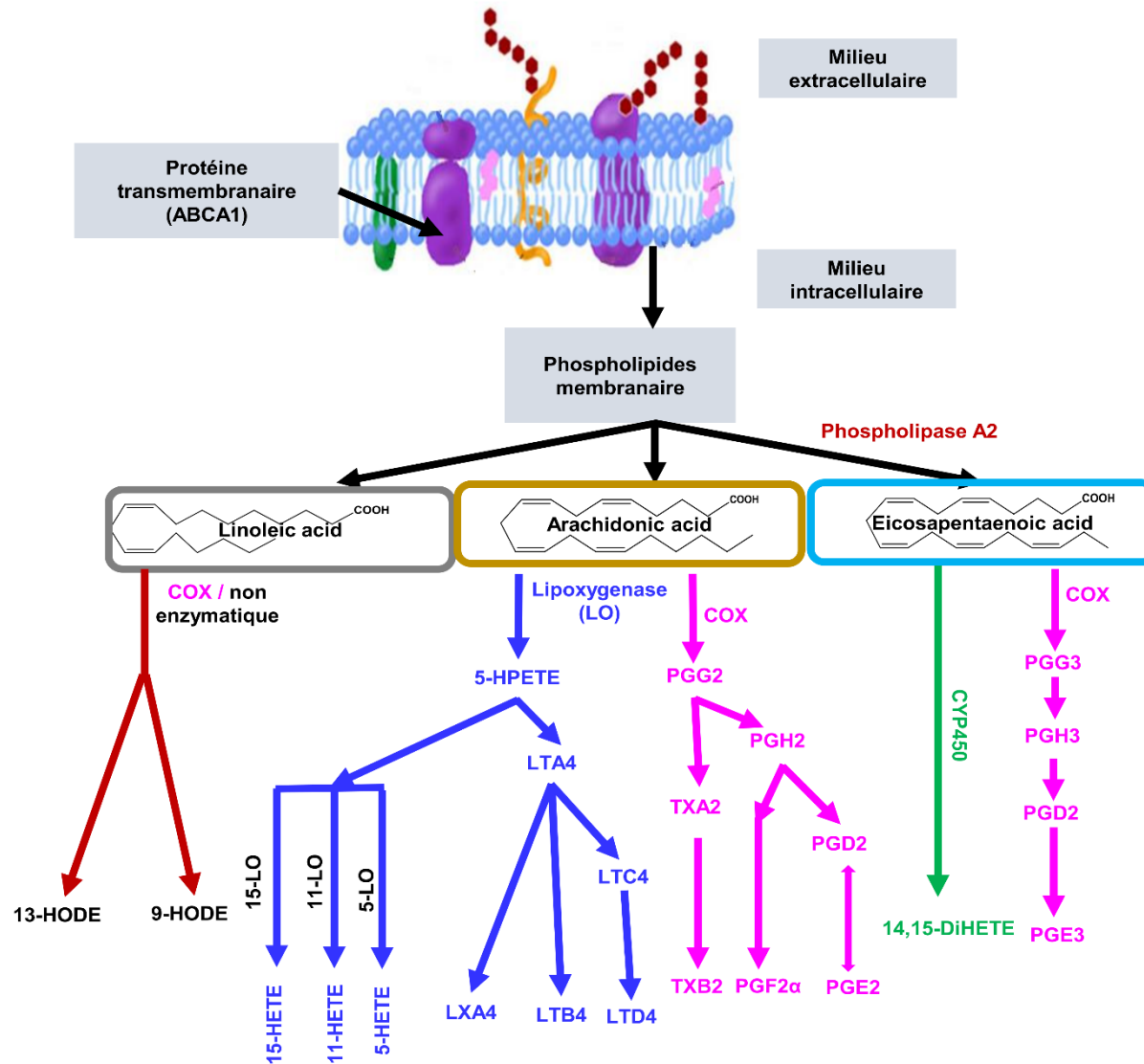
Pour toutes les conditions, C correspond à l'état basal, LPS correspond à l'état stimulé, le dernier chiffre (8-24) sont les temps d'incubation et/ ou de stimulation. Les échantillons sont ensuite analysés après extraction par RP-HPLC-MS/MS (Orbitrap® Velos Pro). Phase stationnaire : Accucore™ C30 ; Phase mobile : A (Eau: ACN, 70:30,v/v) contenant 0,04% HCOOH; B(Acétonitrile,100,v) contenant 0,04% HCOOH. T = 25°C ; V injecté = 5µL ; Débit = 0,5mL/min



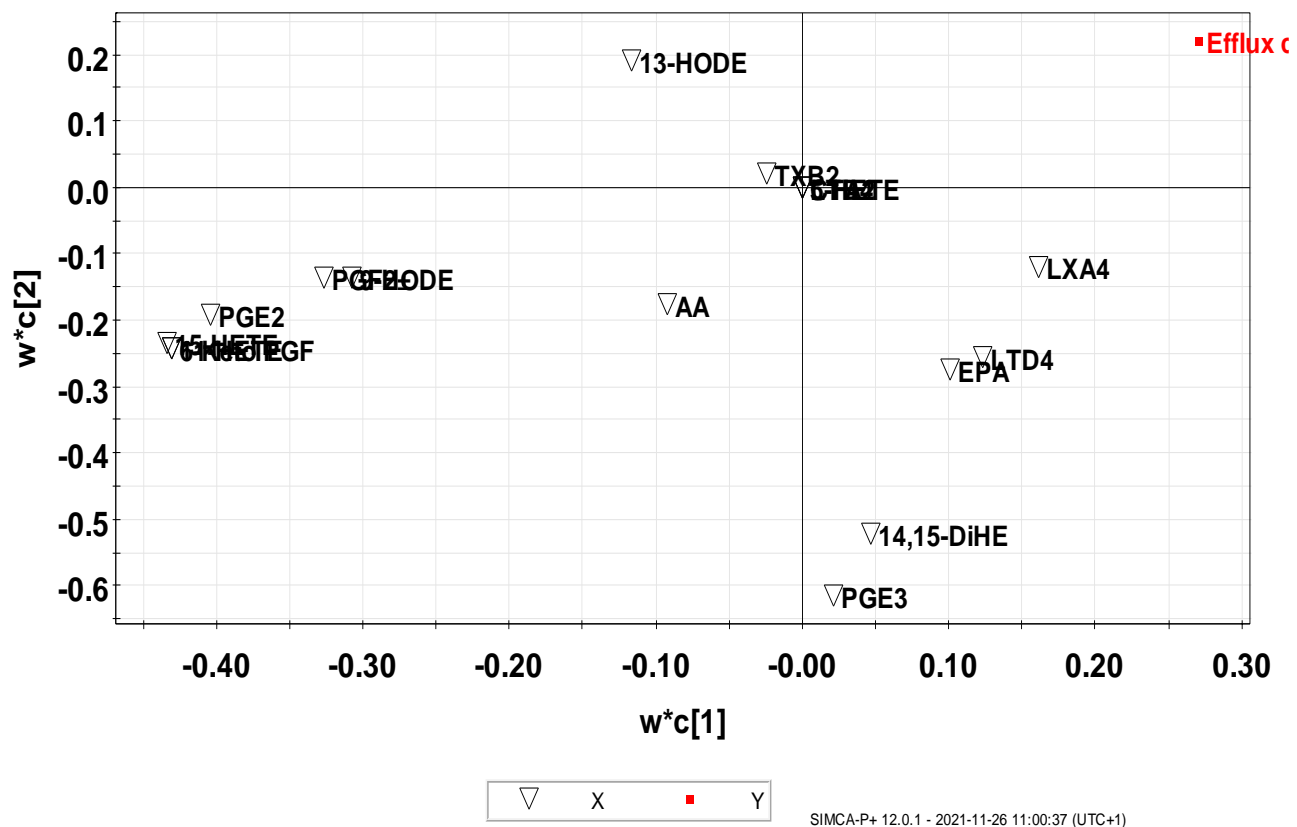
## 6. Evaluation de l'efflux du cholestérol de macrophages THP-1 et J774 non surchargés en cholestérol



## 7. Voie de biogenèse des eicosanoïdes produits par les macrophages THP-1 et J774 suivant différentes conditions de traitement



**8. Loading plot obtenu par régression des moindres carrés partiels appliquée aux oxylipines (variables X) et à l'efflux du cholestérol (variable Y).**



## VI. Publication et communications

### 1. Publication

Investigation of stationary phases performance for eicosanoids profiling in RP-HPLC.

*K Nouwade, S Tfaili, P Chaminade* – Analytical and Bioanalytical Chemistry – 413 (2021) 6551–6569. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03618-8>

### 2. Communications Orales

**Journée des Lipidomystes Bordeaux** - Octobre 2021 : Analyse quantitative des eicosanoïdes relargués par des macrophages J774 et THP-1 par RP-HPLC couplée au LTQ-Orbitrap® Vélos Pro® pour le suivi du processus inflammatoire

*K. Nouwade, S. Tfaili, H. Dakroub, B. Prost, A. Solgadi, J-L. Paul, N. Fournier, P. Chaminade.*

**Congrès SEP Paris** - Octobre 2021 : Nouvelle Méthode en RP-HPLC-HRMS en mode data dependent acquisition pour l'identification et la quantification des eicosanoïdes dans le cadre de l'athérosclérose

*K. Nouwade, S. Tfaili, B. Prost, H. Dakroub, D. Libong, A. Solgadi, J-L. Paul, N. Fournier, and P. Chaminade.*

**Journée Scientifique de l'AESAP** - Juin 2021 : Complémentarité de la CLHP à polarité de phases normale ou inversée pour l'analyse des eicosanoïdes

*K. Nouwade, S. Tfaili, P. Chaminade.*

**Journée de l'école Doctorale 2MIB** - Juin 2021 : Investigation of stationary phases performance for THP-1 and J774 eicosanoids profiling in RP-HPLC

*K. Nouwade, S. Tfaili, P. Chaminade.*

**Journée scientifique du club Ile de France de l'AFSEP - Avril 2021 : Profilage des eicosanoïdes: comparaison de phases stationnaires en RP-HPLC**

*K. Nouwade, S. Tfaili, P. Chaminade.*

### **3. Communications par voie d'affiches**

**ULLA online Summer School – Juillet 2021 : Columns selection based on hydrophobic subtraction model: subtleties for eicosanoids analysis in RP HPLC.**

*K. Nouwade, S. Tfaili, P. Chaminade.*

**5ème Journée de l'école doctorale, 2MIB – Juin 2019 : Towards a high-throughput ultra-performance liquid chromatography method coupled to Corona-CAD® for the analysis of eicosanoids as biomarkers of atherosclerosis**

*K. Nouwade, S. Tfaili, P. Chaminade.*



**Titre :** Lipidomique des eicosanoïdes en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse dans le cadre de l'athérosclérose

**Mots clés :** Lipidomique, Eicosanoïdes, Chromatographie Liquide, Spectrométrie de Masse, Athérosclérose

**Résumé :** L'athérosclérose est une maladie immuno-inflammatoire multifactorielle aboutissant à une réduction de la lumière des artères due notamment au dépôt de lipides et de macrophages gorgés de cholestérol. La seule possibilité qu'ont ces cellules de se débarrasser du cholestérol en excès est de le céder à des accepteurs extracellulaires. Cet efflux du cholestérol est la première étape du transport inverse du cholestérol qui rapporte le cholestérol au foie, le seul organe capable de le dégrader. Des travaux récents dans l'unité interdisciplinaire Lip(Sys)<sup>2</sup> ont permis de montrer que des modifications chroniques de la composition en acides gras (AG) des phospholipides de la membrane des macrophages J774 et THP-1 par incorporation d'AG polyinsaturés, influencent la variation de l'efflux du cholestérol et semblent également dépendre de la lignée cellulaire. Parmi les pistes d'explorations du mécanisme moteur de cette variation d'efflux sont évoqués les eicosanoïdes qui impacteraient la phosphorylation des résidus sérine de la protéine d'efflux ABCA1 et modifieraient son fonctionnement. Les eicosanoïdes sont des molécules structurellement complexes, avec de nombreuses fonctions labiles. Leur détection et leur quantification constituent un défi du fait qu'elles sont présentes à l'état de trace dans les matrices biologiques. L'objectif de cette étude est de développer des méthodes en chromatographie liquide et en spectrométrie de masse pour la quantification des eicosanoïdes dans des modèles de macrophages (J774 et THP-1) dans différentes conditions inflammatoires mimant l'athérosclérose.

La séparation chromatographique a été développée sur sept colonnes sélectionnées sur la base du modèle de soustraction hydrophobe. Une comparaison des performances chromatographiques en RP-HPLC via différents descripteurs a révélé que Accucore C30 semble appropriée pour la séparation des isomères et isobares d'eicosanoïdes. La méthode en RP-HPLC couplée au LTQ-Orbitrap® Velos Pro en mode DDA (Data Dependent Acquisition) a permis d'analyser l'ensemble des eicosanoïdes. Une segmentation du profil chromatographique et une optimisation des énergies de collision par HCD pour chaque eicosanoïde ont permis d'augmenter significativement la fréquence d'acquisition et le seuil de détection : de l'ordre de 2 pg pour quelques prostanoides et de 0.02-2 pg pour certains leucotriènes et espèces oxydées. Cette approche constitue une alternative à la détection des eicosanoïdes sur un spectromètre de masse en mode MRM. Cette nouvelle méthode a permis de suivre spécifiquement environ 24 eicosanoïdes et d'identifier des espèces sécrétées par les macrophages J774 et THP-1. Les profils quantitatifs et qualitatifs montrent une variation des eicosanoïdes dépendant du type cellulaire et du temps de stimulation. Une corrélation entre l'efflux du cholestérol et la variation entre les différentes familles d'eicosanoïdes a été mise en lumière au travers de quatre potentiels biomarqueurs, offrant ainsi des pistes pour la compréhension du développement de l'athérosclérose.

**Title :** Lipidomics of eicosanoids in liquid chromatography coupled to mass spectrometry in the context of atherosclerosis

**Keywords :** Lipidomic, Eicosanoids, Liquid Chromatography, Mass Spectrometry, Atherosclerosis

**Abstract :** Atherosclerosis is a multifactorial immuno-inflammatory disease leading to a reduction of the arteries lumen due to the lipid and foam macrophages deposit. The only way to remove the excess accumulated cholesterol from foam macrophages is to transfer it to extracellular acceptors. This cholesterol efflux is the first step of the reverse cholesterol transport pathway that delivers cholesterol to the liver, the sole organ able to break it down. Recent work in the interdisciplinary unit Lip(Sys)<sup>2</sup> has shown chronic modifications of the phospholipids fatty acid (FA) composition in the membrane of J774 and THP-1 macrophages by incorporating polyunsaturated FAs influence the cholesterol efflux variation and would depend on the cell line. Among the driving mechanism of this efflux variation, eicosanoids would impact the serine residues phosphorylation of the ABCA1 efflux protein and affect its function. Eicosanoids are structurally complex molecules with many labile functions. Their detection and quantification are challenging because they are present at trace amounts in biological matrices. This study aims to develop liquid chromatography-mass spectrometry methods to quantify eicosanoids in macrophage models (J774 and THP-1) under different inflammatory conditions to mimic atherosclerosis.

We developed chromatographic separation on seven columns based on the hydrophobic subtraction model. A comparison of the chromatographic performance in RP-HPLC through different descriptors revealed Accucore C30 as suitable for the eicosanoids' isomers and isobars separation. RP-HPLC method coupled to LTQ-Orbitrap® Velos Pro in DDA (Data Dependent Acquisition) mode permitted to monitor all eicosanoids of the study. A segmentation of the chromatographic profile and optimization of the collision energies by HCD for each eicosanoid increased the acquisition frequency significantly and the detection threshold: around 2 pg for some prostanoids and 0.02-2 pg for some leukotrienes and oxidized species. Thus, this approach constitutes an alternative for eicosanoids detection on Mass Spectrometry in MRM mode. This novel method monitored 24 eicosanoids and identified species released by J774 and THP-1 macrophages. The quantitative and qualitative profiles exhibited eicosanoids fluctuations depending on the cell type and the stimulation time. A correlation between cholesterol efflux and different eicosanoid families was highlighted through four potential biomarkers, thus offering leads for the understanding of atherosclerosis development.