

# THESE

Présentée devant  
L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

Pour l'obtention du  
DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité Biochimie  
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

par

**Miao LIU**

**Caractérisation de métabolites oxygénés  
issus de l'acide alpha-linolénique  
Effets anti-agrégants et anti-inflammatoires**

Soutenance le 10 juillet 2013

Directeur de thèse : Professeur M. GUICHARDANT

Jury de thèse:

Docteur D. BLACHE (Rapporteur)  
Professeur M. LINDER (Rapporteur)  
Docteur T. DURAND (Rapporteur)  
Docteur E. VERICEL  
Professeur M. LAGARDE  
Professeur M. GUICHARDANT

Cette thèse a été préparée au laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition (CarMeN), Insem U 1060, l'INSA de Lyon

*INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015*

<b>SIGLE</b>	<b>ECOLE DOCTORALE</b>	<b>NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE</b>
<b>CHIMIE</b>	<u>CHIMIE DE LYON</u> <a href="http://www.edchimie-lyon.fr">http://www.edchimie-lyon.fr</a>  Insa : R. GOURDON	<b>M. Jean Marc LANCELIN</b> Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 <a href="mailto:directeur@edchimie-lyon.fr">directeur@edchimie-lyon.fr</a>
<b>E.E.A.</b>	<u>ELECTRONIQUE,</u> <u>ELECTROTECHNIQUE,</u> <u>AUTOMATIQUE</u> <a href="http://edeea.ec-lyon.fr">http://edeea.ec-lyon.fr</a>  Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN <a href="mailto:eea@ec-lyon.fr">eea@ec-lyon.fr</a>	<b>M. Gérard SCORLETTI</b> Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 65 55 Fax : 04 78 43 37 17 <a href="mailto:Gerard.scorletti@ec-lyon.fr">Gerard.scorletti@ec-lyon.fr</a>
<b>E2M2</b>	<u>EVOLUTION, ECOSYSTEME,</u> <u>MICROBIOLOGIE, MODELISATION</u> <a href="http://e2m2.universite-lyon.fr">http://e2m2.universite-lyon.fr</a>  Insa : H. CHARLES	<b>Mme Gudrun BORNETTE</b> CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 06.07.53.89.13 <a href="mailto:e2m2@univ-lyon1.fr">e2m2@univ-lyon1.fr</a>
<b>EDISS</b>	<u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-</u> <u>SANTE</u> <a href="http://www.ediss-lyon.fr">http://www.ediss-lyon.fr</a>  Sec : Samia VUILLERMOZ Insa : M. LAGARDE	<b>M. Didier REVEL</b> Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68.49.09 Fax :04 72 68 49 16 <a href="mailto:Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr">Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr</a>
<b>INFOMATHS</b>	INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES <a href="http://infomaths.univ-lyon1.fr">http://infomaths.univ-lyon1.fr</a>  Sec :Renée EL MELHEM	<b>Mme Sylvie CALABRETTO</b> Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 <a href="mailto:infomaths@univ-lyon1.fr">infomaths@univ-lyon1.fr</a>
<b>Matériaux</b>	MATERIAUX DE LYON <a href="http://ed34.universite-lyon.fr">http://ed34.universite-lyon.fr</a>  Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry <a href="mailto:Ed.materiaux@insa-lyon.fr">Ed.materiaux@insa-lyon.fr</a>	<b>M. Jean-Yves BUFFIERE</b> INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 <a href="mailto:Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr">Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr</a>
<b>MEGA</b>	<u>MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE</u> <u>CIVIL, ACOUSTIQUE</u> <a href="http://mega.ec-lyon.fr">http://mega.ec-lyon.fr</a>  Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry <a href="mailto:mega@insa-lyon.fr">mega@insa-lyon.fr</a>	<b>M. Philippe BOISSE</b> INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72 .43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37  <a href="mailto:Philippe.boisse@insa-lyon.fr">Philippe.boisse@insa-lyon.fr</a>
<b>ScSo</b>	<b>ScSo*</b> <a href="http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/">http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/</a>  Sec : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS Insa : J.Y. TOUSSAINT	<b>M. OBADIA Lionel</b> Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48 <a href="mailto:Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr">Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr</a>

\*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

# REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'unité Inserm 1060, laboratoire CarMeN (Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition) dirigé par **Hubert Vidal** dans le laboratoire IMBL de INSA de Lyon dirigé par **Isabelle Vanenbroucke**.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux **Dr. Hubert Vidal, Pr. Michel Lagarde, Pr. Philippe Moulin et Pr. Isabelle Vandebroucke** pour m'avoir accueillie au sein de votre unité de recherche, et je tiens à vous remercier sincèrement pour les conseils et les encouragements tout au long de ce travail.

Je remercie le **Dr. Denis Blache**, le **Pr. Michel Linder** et le **Dr. Thierry Durand** pour avoir pris le temps d'apporter leur regard d'expert sur ce travail et m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail. Vos remarques ont contribué à améliorer la qualité de ce mémoire.

Je tiens à remercier le **Pr. Michel Lagarde** pour avoir su donné l'impulsion scientifique à ce travail et pour m'avoir aidé à le valoriser tout au long de ces années. Votre rigueur scientifique, votre esprit critique, vos remarques en matière de biochimie et le temps consacré à la correction de mon manuscrit ont permis de mieux structurer ce travail. Je vous exprime mon profond respect.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance au **Pr. Michel Guichardant** sans qui cette thèse n'aurait pu être réalisée. Votre grande expérience et vos connaissances scientifiques dans le domaine analytique m'ont donné le goût de continuer dans ce domaine. Je vous remercie particulièrement pour votre rigueur scientifique, votre exigence, votre disponibilité, votre patience, vos encouragements et votre aide de la rédaction du manuscrit. Merci également pour m'avoir supportée durant ces années. Je vous exprime mes sincères remerciements et mon profond respect. Je remercie aussi votre ancienne thésarde le **Dr. Ping Chen** pour avoir accompagné mes premiers pas dans le domaine de la "lipidomique".

Je remercie sincèrement le **Dr. Evelyne Véricel** qui m'a beaucoup aidée tout au long de ces années. Je vous remercie notamment pour avoir corrigé mon manuscrit,

votre rigueur scientifique, vos encouragements et vos conseils. Vous avez largement contribué aux résultats présentés dans ce mémoire.

Je remercie particulièrement **M. Moreno Lelli** et **Mme. Laetitia Béguin** pour votre aide à réaliser et interpréter les spectres RMN.

Je voudrais aussi remercier le **CSC (Chinese Scholarship Council)** qui m'a apporté un soutien financier.

Je souhaite également exprimer mes remerciements à tous les membres du laboratoire :

Au **Dr. Madeleine Picq**, pour avoir corrigé la partie de RMN en français dans ce mémoire et merci également pour votre esprit agréable, des beaux cadeaux, des bons gâteaux.

Au **Dr. Catherine Calzada**, pour votre aide, votre gentillesse, votre disponibilité, votre bonne humeur de tous les instants et les bonbons au caramel.

A « **Dr Patricia Daira** », « **Pr Baptiste Fourmaux** » et « **Dr Mayssa Hachem** », mes collègues du bureau, pour votre patience à comprendre mon français, pour votre gentillesse, votre aide ainsi que pour tous les merveilleux moments passés ensemble au bureau.

Au **Dr. Nathalie Bernoud-Hubac**, pour ta gentillesse et tes encouragements.

A **Patrick Molière**, pour ta patience, tes multiples services rendus (surtout informatique).

Au **Dr. Christophe Soulage**, pour votre aide statistique StatView.

A **Huy le Quang**, pour m'avoir fait découvrir les rouleaux de printemps vietnamiens et la culture du Vietnam.

A **Carine Bruscella** et **Marilyne Galindo**, pour votre gentillesse, votre aide et votre disponibilité pour moi.

Au **Dr. Alain Géloën**, **Lilas Hadji**, **Marion Létisse** et **Romain Schmitt**, pour votre aide dans mon travail et pour m'avoir enseigné le français.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour votre aide et tous les moments passés ensemble.

Je remercie mes parents, ma sœur, mon copain m'ont soutenu pendant ces années.

# RESUME

Les acides gras de la série n-3 et notamment l'acide docosahexaénoïque (DHA) jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Un de ces métabolites, la protectine DX (PDX), qui est un isomère de la protectine D1 (PD1) (Chen P *et al.*, 2009), inhibe l'agrégation des plaquettes sanguines. D'autres composés similaires appelés "poxytrins", qui possèdent aussi un triène conjugué avec une géométrie *E,Z,E*, ont également été synthétisés à partir d'autres acides gras polyinsaturés (AGPI) *via* la 15-lipoxygénase de soja (sLOX). Ces composés présentent des propriétés anti-agrégantes en inhibant la cyclo-oxygénase plaquettaire et le récepteur du thromboxane A<sub>2</sub> (Chen P *et al.*, 2011).

Dans cette thèse, nous décrivons de nouveaux composés di-hydroxylés synthétisés par la sLOX à partir de l'acide alpha-linolénique (ALA ou acide octadécatriénoïque, 18:3n-3), un acide gras polyinsaturé indispensable consommé au niveau du gramme chez l'Homme adulte. Il est converti en acides gras mono-hydroxylés et di-hydroxylés. Ces composés ont été séparés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse et caractérisés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) après dérivation adéquate. Un acide gras mono-hydroxylé, majoritaire, l'acide 13(S)-hydroxy-octadécatriénoïque (13(S)-HOTE) et quatre acides gras di-hydroxylés ont été détectés. Ces derniers présentent tous un spectre UV caractéristique avec une absorption maximale à 270 nm et deux épaulements à 260 et 280 nm. Les spectres UV de deux d'entre eux sont superposables à celui de la PDX, ce qui suggère une géométrie *E,Z,E* des doubles liaisons de leur triène. La caractérisation complète de ces composés a été réalisée par résonance magnétique nucléaire (RMN) à haut champ et par GC-MS. Ce sont les acides 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*E*,14*E*-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*E*,14*E*-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque. Ils sont également synthétisés par la 15-lipoxygénase (15-LOX) recombinante humaine de type 2.

Ces composés di-hydroxylés 9,16-diHOTEs ont été testés sur les plaquettes isolées à partir du sang humain. Nous avons observé que seules les molécules ayant la géométrie *E,Z,E* du triène conjugué inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène et inhibent la cyclooxygénase-1 (COX-1) de mouton. Les propriétés anti-inflammatoires de ces produits ont également été étudiées. Tous les isomères 9,16-diHOTEs, possédant un triène conjugué avec une géométrie *E,Z,E*, inhibent la cyclooxygénase-2 (COX-2) recombinante humaine et seul l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque inhibe la 5-LOX des leucocytes polymorphonucléaires (PMN), siège de la synthèse des leucotriènes issus de l'acide arachidonique.

En conclusion, les composés dihydroxylés possédant un triène conjugué *E,Z,E*, issus de l'ALA, ainsi que la PDX, inhibent l'activité des COX-1 et COX-2, et seraient anti-agrégants et anti-inflammatoires. Ces résultats donnent des perspectives pharmacologiques aux recommandations nutritionnelles promouvant la consommation d'acide alpha linoléique.

**MOTS-CLES:** Acide octadéca-triénoïque, Acide-9,16-dihydroxy-octadéca-triénoïque, 15-lipoxygénase de soja (sLOX), Chromatographie liquide à haute performance (HPLC), Spectrométrie de masse, Résonance magnétique nucléaire (RMN), Agrégation plaquettaire, Leucocytes humains

## SUMMARY

N-3 fatty acids, especially docosahexaenoic acid (DHA), play an important role in the prevention of cardiovascular diseases. One metabolite of DHA, protectin DX (PDX), an isomer of protectin D1 (PD1) (Chen P *et al.*, 2009), inhibits blood platelet aggregation. Similar compounds called "poxytrins", which have a conjugated triene with a *E,Z,E* geometry, have also been synthesized from other polyunsaturated fatty acids (PUFA) by soybean lipoxygenase. They have anti-aggregating properties by inhibiting platelet cyclooxygenase and thromboxane A<sub>2</sub> receptor (Chen P *et al.*, 2011).

In this thesis, we describe new dihydroxy compounds synthesized by the soybean 15-lipoxygenase from alpha-linolenic acid (ALA ou octadecatrienoic acid, 18:3n-3), an essential PUFA that is consumed in the gram range in human adults. It is converted into mono-hydroxylated and dihydroxylated derivatives. These compounds were separated by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) after appropriate derivatization. A main mono-hydroxylated fatty acid, 13(S)-hydroxy-octadecatrienoic acid (13(S)-HOTE) and four dihydroxylated fatty acids were detected. The last ones have all a characteristic UV spectrum with a maximum absorbance at 270 nm with two shoulder peaks at 260 and 280 nm. The UV spectra from two of them are superimposable to that of PDX, suggesting a *E,Z,E* geometry for their conjugated triene. The complete characterization of these compounds was performed by high field nuclear magnetic resonance (NMR) and by GC-MS. These are the 9(R),16(S)-dihydroxy-octadeca-10*E*,12*E*,14*E*-trienoic, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadeca-10*E*,12*E*,14*E*-trienoic, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadeca-10*E*,12*Z*,14*E*-trienoic and 9(R),16(S)-dihydroxy-octadeca-10*E*,12*Z*,14*E*-trienoic acids. They can also be synthesized by the (type 2) 15 human recombinant lipoxygenase.

These dihydroxylated compounds (9,16-diHOTEs) were tested on isolated human blood platelets. We observed that only molecules containing a conjugated triene with a *E,Z,E* geometry are able to inhibit platelet aggregation induced by collagen, and inhibit sheep cyclooxygenase-1 (COX-1). The anti-inflammatory properties of these products

were also studied. All 9,16-diHOTEs isomers having a conjugated triene with a *E,Z,E* geometry, inhibit human recombinant cyclooxygenase-2 (COX-2) and only 9(R),16(S)-dihydroxy-octadeca-10*E*,12*Z*,14*E*-trienoic acid inhibits polymorphonuclear leukocytes (PMN) 5-lipoxygenase which is involved in the leukotriene synthesis from arachidonic acid.

In conclusion, the *E,Z,E* dihydroxylated compounds from 18:3n-3, as well as PDX, inhibiting the COX-1 and COX-2 activities, appear to be anti-aggregatory and anti-inflammatory agents. These results provide pharmacological perspectives to nutritional recommendations promoting the intake of alpha-linolenic acid.

**KEY WORDS:** Octadecatrienoic acid, 9,16-dihydroxy-octadecatrienoic acid, Soybean 15-lipoxygenase, High performance liquid chromatography (HPLC), Mass spectrometry, Nuclear magnetic resonance (NMR), Platelet aggregation, Human leukocytes



# AVANT PROPOS

## Publications scientifiques :

**Miao Liu**, Ping Chen, Evelyne Véricel, Moreno Lelli, Laetitia Béguin, Michel Lagarde, and Michel Guichardant. Characterization and biological effects of dihydroxylated compounds deriving from the lipoxygenation of alpha-linolenic acid. *J Lipid Res*, 2013, 54(8): 2083-2094.

**Miao Liu**, Tarek Boussetta, Karama Makni, Fathi Driss, Michèle Fay, Jamel El-Benna, Michel Lagarde, and Michel Guichardant. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits ROS production in human neutrophils, and cyclooxygenases activities. *Lipids*, 2013 (en revision).

**Miao Liu**, Ping Chen, Evelyne Véricel, Michel Lagarde, and Michel Guichardant. Anti-aggregatory and anti-inflammatory effects of protectin DX, a major 15-lipoxygenase product of docosahexaenoic acid. (Abstracts) *Chem Phys Lipids*, 2011, 164S: S50.

Michel Lagarde, **Miao Liu**, Evelyne Véricel, Catherine Calzada, Ping Chen, Fathi Driss and Michel Guichardant. Dietary docosahexaenoic acid and protectin synthesis: relevance against athero-thrombogenesis. *Proc Nutr Soc*, 2013 (sous presse)

Guichardant Michel, Chen Ping, **Liu Miao**, Calzada Catherine, Colas Romain, Véricel Evelyne and Lagarde Michel. Functional lipidomics of oxidized products from polyunsaturated fatty acids. *Chem Phys Lipids*, 2011, 164(6): 544-548.

## Communications orales et affichées

**Liu M**, Véricel E, Chen P, Lelli M, Beguin L, Lagarde M and Guichardant M. Full characterization of lipoxygenase-derived dihydroxylated fatty acids from alpha- and gamma-linolenic acids. (Oral) *3<sup>rd</sup> European Lipidomic Meeting (ELM)*, July, 2013, Pardubice, Czech Republic.

**Liu M**, Véricel E, Chen P, Lelli M, Beguin L, Lagarde M and Guichardant M. Structure and biological properties of dihydroxylated metabolites from alpha-linolenic acid produced by 15-lipoxygenase. (Poster) *13<sup>ème</sup> Journée Scientifique Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*, June, 2013, Dijon, France.

**Liu M**, Véricel E, Chen P, Boussetta T, Makni K, Driss F, Lagarde M and Guichardant M. Poxytins, a new family of lipoxygenase products from polyunsaturated fatty acids, are doted of anti-atherothrombotic potential. (Poster) *81<sup>st</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS)*, June, 2013, Lyon, France.

Michel Lagarde, **Miao Liu**, Evelyne Véricel, Catherine Calzada, Ping Chen, Fathi Driss and Michel Guichardant. Dietary docosahexaenoic acid and protectin synthesis: relevance against athero-thrombogenesis. (Oral) *The Nutrition Society Scottish Section Meeting*, March, 2013, Edinburgh, UK.

**Liu M**, Véricel E, Chen P, Lelli M, Beguin L, Lagarde M and Guichardant M. Structure and biological properties of dihydroxylated metabolites of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) produced by 15-lipoxygenation. (Poster) *53<sup>rd</sup> International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL)*, September, 2012, Banff, Canada.

**Liu M**, Lelli M, Beguin L, Lagarde M and Guichardant M. Structure and biological functions of dihydroxylated metabolites synthesized from alpha-linolenate by soybean lipoxygenase. (Poster) *20<sup>th</sup> International Symposium on Plant Lipids (ISPL)*, July, 2012, Sevilla, Spain.

**Liu M**, Chen P, Véricel E, Lagarde M, and Guichardant M. New dihydroxylated compounds deriving from octadecatrienoic acids. (Poster) *12<sup>ème</sup> Journée Scientifique Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*, May, 2012, Lyon, France.

Michel Lagarde, Catherine Calzada, **Miao Liu**, Michel Guichardant, Evelyne Véricel. Dose-effect and Metabolism of Docosahexaenoic acid. Pathophysiological relevance. (Oral) *Fatty Acid in Cell Singaling (FACS): Docosahexaenoid Acid in Translational Medicine*, November, 2011, New Orleans, USA

**Liu M**, Chen P, Véricel E, Lagarde M, and Guichardant M. Anti-aggregatory and anti-inflammatory effects of protectin DX, a major 15-lipoxygenase product of docosahexaenoic acid. (Poster) 52<sup>nd</sup> *International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL)*, September, 2011, Warsaw, Poland.

**Liu M**, Chen P, Véricel E, Lagarde M, and Guichardant M. New dihydroxylated compounds deriving from octadecatrienoic acids. (Poster) 8<sup>th</sup> Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique (*GERLI*) *Lipidomics meeting: Membranes & Bioactive Lipids*, October, 2011, Lyon, France.

**Liu M**, Chen P, Véricel E, Lagarde M, and Guichardant M. Anti-aggregatory and anti-inflammatory effects of protectin DX. (Poster) 11<sup>ere</sup> *Journée Scientifique Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*, May, 2011, Montpellier, France.

Guichardant M, Chen P, **Liu M**, Véricel E and Lagarde M. Conjugated trienes in fatty acids and oxygenated derivatives. (Poster) 51<sup>st</sup> *International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL)*, September, 2010, Bilbao, Spain.

# TABLE DE MATIERES

<b>REMERCIEMENT</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>AVANT PROPOS</b> .....	<b>9</b>
<b>TABLE DE MATIERES</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b> .....	<b>16</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>18</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>22</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>26</b>
<b>Chapitre 1: Rappels sur les acides gras polyinsaturés et leur métabolisme</b>	
<b>oxygéné</b> .....	<b>27</b>
I. Acides gras polyinsaturés (AGPIs) .....	27
II. Oxygénation des acides gras polyinsaturés (AGPIs) et notamment de l'acide arachidonique (AA) .....	29
II.1 Voie de la COX.....	30
II.1.1 La voie des prostaglandines .....	32
II.1.2 La voie du thromboxane A <sub>2</sub> (TXA <sub>2</sub> ): .....	34
II.2 Voie des LOX .....	35
II.2.1 Mécanisme général des LOXs.....	35
II.2.2 Voie de la 12- LOX .....	37
II.2.3 Voie de la 15-LOX .....	39
II.2.4 Voie de la 5-LOX .....	42
II.2.5 La voie des époxygénases et des cytochromes P450 ω-ou ω-1-oxygénases .....	45
III. Métabolites oxygénés particuliers: les “specialized pro-resolving mediators” (SPM).....	47
III.1 Les lipoxines.....	47
III.2 Les résolvines (Rv).....	50
III.2.1 Les résolvines E (RvE) .....	50

III.2.2 Les résolvines D (RvD).....	52
III.3 Les protectines.....	54
III.3.1 La protectine D1 (PD1).....	55
III.3.2 La protectine DX (PDX).....	57
III.4 Les marésines .....	59
IV. Les métabolismes oxygénés de l'ALA.....	60
IV.1 $\beta$ -oxydation.....	61
IV.2 Voies de la désaturation et d'élongation de l'ALA.....	61
IV.3 Métabolisme oxygéné de l'ALA par les LOXs.....	62
IV.4 Métabolisme de l'ALA en phytoprostanes .....	68
<b>Chapitre 2 : Rappels sur les plaquettes sanguines et les leucocytes polynucléaires neutrophiles (PMNs).....</b>	<b>64</b>
I. Les plaquettes sanguines .....	68
I.1 Origine et structure.....	68
I.1.1 La membrane .....	68
I.1.2 Cytosquelette .....	69
I.1.3 Cytoplasme .....	69
I.2 Physiologie.....	70
I.2.1 Adhésion.....	70
I.2.2 Activation.....	70
I.2.3 Agrégation .....	72
I.3 Métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes .....	72
II. Les leucocytes polynucléaires neutrophiles (PMNs).....	73
II.1 Les différentes classes de leucocytes.....	73
II.2 Morphologie et origine des polynucléaires neutrophiles.....	74
II.3 Fonctions principales des polynucléaires neutrophiles.....	74
II.4 Les médiateurs de l'inflammation produits par les polynucléaires neutrophiles .....	76
II.4.1 Médiateurs peptidiques: cytokines et chimiokines.....	77
II.4.2 Médiateurs lipidiques .....	78
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>80</b>

<b>Chapitre 1 : Matériels.....</b>	<b>81</b>
I. Produits.....	81
II. Appareils .....	82
<b>Chapitre 2 : Méthodes .....</b>	<b>83</b>
I. Biosynthèse des acides gras mono- et di-hydroxylés.....	83
I.1 Biosynthèse des acides 9,16-dihydroxy-ALA .....	83
I.2 Extraction en phase solide des métabolites oxygénés.....	83
I.3 Extraction liquide/liquide des métabolites oxygénés.....	84
I.4 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des acides gras mono- et di-hydroxylés.....	84
I.5 Analyse par HPLC des acides gras mono- et di-hydroxylés.....	84
I.6 Analyse par GC-MS des acides gras mono- et di-hydroxylés .....	85
I.6.1 Préparation du diazométhane.....	85
I.6.2 Dérivation des acides gras mono- et di-hydroxylés .....	85
I.6.3 Localisation par GC-MS des groupements hydroxyles présents sur la chaîne carbonée.....	86
I.7 Analyse par RMN des 9, 16-diHOTEs .....	87
I.8 Préparation du 9(±)-HOTE racémique à partir de l'ALA.....	87
I.9 Incubation de l'ALA et 9(S)-HOTE avec la 15-LOX-2 recombinante humaine .....	87
II. Isolement des plaquettes sanguines humaines .....	90
III. Isolement des leucocytes polymorphonucléaires.....	90
IV. Mesure de l'agrégation des plaquettes sanguines humaines induite par le collagène .....	91
V. Incubation 9,16-diHOTEs avec des leucocytes polymorphonucléaires .....	92
VI. Mesure de marqueurs de l'inflammation : prostaglandines E <sub>2</sub> et D <sub>2</sub> produites par la COX-1 de mouton et la COX-2 recombinante humaine incubées avec les acides gras di-hydroxylés synthétisés à partir de l'ALA .....	92
VI.1 Biosynthèse des prostaglandines E <sub>2</sub> et D <sub>2</sub> produites par la COX-1 et la COX-2.....	92
VI.2 Dérivation des prostaglandines E <sub>2</sub> et D <sub>2</sub> .....	93

VI.3 Analyse des prostaglandines par GC-MS .....	94
VII. Analyse statistique des résultats .....	94
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>96</b>
I. Caractérisation des métabolites oxygénés dérivés de l'ALA (18:3n-3).....	97
I.1 Analyse chromatographique des métabolites dérivés de l'ALA.....	97
I.2 Localisation des groupements hydroxylés sur la chaîne hydrocarbonée .....	99
I.3 Détermination de la stéréochimie des carbones 9 et 16 des métabolites di- hydroxylés dérivés de l'ALA .....	102
I.4 Détermination de la géométrie des doubles liaisons par RMN à haut champ	105
I.5 Métabolisme de l'ALA par la 15-LOX-2 recombinante humaine .....	109
I.6 Conclusion de l'étude du métabolisme oxygéné de l'ALA .....	110
II. Effet anti-agrégant et anti-inflammatoire de 9,16-diHOTEs .....	111
II.1 Effet inhibiteur des isomères 9,16-diHOTEs sur la COX-1 et effets anti- agrégant .....	111
II.2 Effet anti-inflammatoire des 9,16-diHOTEs .....	113
II.2.1 Effet des isomères 9,16-diHOTEs sur la COX-2 recombinante humaine .....	114
II.2.2 Effet des isomères 9,16-diHOTEs sur le métabolisme de l'acide arachidonique par la 5-LOX des leucocytes polymorphonucléaires humains .....	115
II.3 Conclusion .....	116
III. Discussion générale .....	117
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>121</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>122</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>123</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>124</b>

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<i>Figure 1: Structure et nomenclature des acide gras polyinsaturés</i> .....	27
<i>Figure 2: Voies métaboliques des acides gras essentiels</i> .....	28
<i>Figure 3: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique-voie de la COX</i> .....	32
<i>Figure 4: Métabolisme oxygéné des acides gras polyinsaturés par les LOXs</i> .....	36
<i>Figure 5: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique – voie de la 12-LOX conduisant à la synthèse des hépoxilines</i> .....	39
<i>Figure 6: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique - voie de la 15-LOX</i> .....	42
<i>Figure 7: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique - voie de la 5-LOX</i> .....	44
<i>Figure 8: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique - voie des cytochrome P450 époxygénases</i> .....	46
<i>Figure 9: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique conduisant à la synthèse des lipoxines</i> .....	48
<i>Figure 10: Schéma montrant la voie de la 15-épiLXA<sub>4</sub></i> .....	49
<i>Figure 11: Schéma montrant la biosynthèse des resolvines E</i> .....	52
<i>Figure 12: Schéma montrant la biosynthèse des resolvines D</i> .....	54
<i>Figure 13: Schéma montrant la biosynthèse de la protectine D1</i> .....	56
<i>Figure 14: Schéma montrant la biosynthèse de PDX</i> .....	57
<i>Figure 15: Structure de la PDX et de la PDI</i> .....	58
<i>Figure 16: Schéma montrant la biosynthèse de la marésine 1</i> .....	60
<i>Figure 17: Schéma montrant le métabolisme de l'ALA par sLOX</i> .....	63
<i>Figure 18: Biosynthèse de l'acide jasmonique</i> .....	65
<i>Figure 19: Mécanisme de formation des phytoprostanes</i> .....	67
<i>Figure 20: Schéma de la migration chimiotactique des leucocytes vers un site d'inflammation</i> .....	76
<i>Figure 21: Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant la séparation du 9(±)-HOTE racémique synthétisé par l'oxygène à partir de l'ALA</i> .....	88



<b>Figure 22:</b> Spectre de masse en impact électronique du 9(±)-HOTE racémique synthétisé chimiquement en présence d'oxygène à partir de l'ALA après dérivation et hydrogénation .....	89
<b>Figure 23:</b> Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant les différents métabolites synthétisés à partir de l'ALA via la sLOX .....	98
<b>Figure 24:</b> Comparaison des spectres UV de différents acides gras di-hydroxylés commerciaux séparés par HPLC .....	99
<b>Figure 25:</b> Spectre de masse en impact électronique des métabolites mono- et di-hydroxylé dérivés de l'ALA après dérivation et hydrogénation .....	101
<b>Figure 26:</b> Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant les différents métabolites synthétisés à partir de 9(S)-HOTE et de 9(±)-HOTE via la sLOX .....	103
<b>Figure 27:</b> Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant les différents métabolites synthétisés à partir de l'ALA, du 9(S)-HpOTE et du 9(S)-HOTE via la sLOX .....	104
<b>Figure 28:</b> Techniques de RMN appliquées à l'acide 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E, 12E, 14E-triénoïque et l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12E,14E-triénoïque pour la détermination de la configuration de la double liaison .....	107
<b>Figure 29:</b> Techniques de RMN appliquées à l'acide 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca- 10E,12Z,14E-triénoïque et l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque pour la détermination de la configuration de la double liaison .....	108
<b>Figure 30:</b> Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant les différents métabolites synthétisés à partir de 9(S)-HOTE et l'ALA via la 15-LOX humaine recombinante .....	110
<b>Figure 31:</b> Effet de 9,16-diHOTES sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène .....	113
<b>Tableau 1:</b> Effet de 9,16-di-HOTES sur la COX-1 de mouton .....	111
<b>Tableau 2:</b> Effet de 9,16-di-HOTES sur la COX-2 humaine recombinante .....	114
<b>Tableau 3:</b> Effet de 9,16-di-HOTES sur la 5-LOX leucocytes humains .....	115
<b>Tableau 4:</b> Effet de la PDX sur la 5-LOX de leucocytes humains .....	116

# ABRÉVIATIONS

AA	acide arachidonique ou 20:4n-6
ADP	adénosine-5'-diphosphate
AG	acides gras
AGPI	acides gras polyinsaturés
AGOH	acides gras mono-hydroxylés
AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
ALA	acide alpha-linolénique ou 18:3n-3
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP-1	activateur de la protéine-1
ASA	aspirine, acide acétylsalicylique
ATP	adénosine triphosphate
BHT	butylhydroxytoluène ou 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide
β-TG	β-thromboglobuline
CCM	chromatographie sur couche mince
COX	cyclooxygénase
diHOTE	acide dihydroxy-octadécatriénoïque
DIPE	N-éthyl diisopropylamine
DHA	acide docosahexaénoïque ou 22:6n-3
DPA	acide docosapentaénoïque ou 22:5n-3
EETs	acides époxy-eicosatriénoïques
EPA	acide eicosapentaénoïque ou 20:5n-3
FLAP	“5-lipoxygenase-activating protein”
GC	chromatographie en phase gazeuse
GC-MS	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GLA	acide gamma-linolénique ou 18:3n-6
HETE	acide hydroxy-eicosatétraénoïque

HHT	acide 12(S)-hydroxy-heptadéca-5Z,8E,10E-triénoïque
HOTE	acide hydroxy-octadécatriénoïque
HpOTE	acide hydroperoxy-octadécatriénoïque
HpETE	acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque
HPLC	chromatographie liquide à haute performance (“high performance lipid chromatography”)
HXs	hépoxyilines
IL-1	Interleukine-1
LA	acide linoléique ou 18:2n-6
LDL	“low density lipoprotein”
LOX	lipoxygénase
LTs	leucotriènes
LTA <sub>4</sub>	leucotriène A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	leucotriène B <sub>4</sub> ,
LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> /F <sub>4</sub>	leucotriène C <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> /F <sub>4</sub>
LXs	lipoxines
MaR	marésine
MDA	dialdéhyde malonique
MIP	"macrophage inflammatory protein"
MOX	chlorhydrate de méthoxylamine
MPO	myéloperoxydase
NaBH <sub>4</sub>	borohydrure de sodium
NMRI	Naval Medical Research Institute
NFAT	facteur nucléaire des cellules T activées
NFκB	facteur nucléaire kappa B
NK	"nature killer"
PDGF	"platelet derived growth factor"
PC	phosphatidylcholine
PD1	protectine D1
PDX	protectine DX
PE	phosphatidyléthanolamine

PFB	pentafluorobenzylbromide
PF-4	facteur plaquettaire 4
PGs	prostaglandines
PGI	prostacycline
PI	phosphatidylinositol
PL	phospholipides
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	phospholipase C
PMN	leucocytes polymorphonucléaires
Poxytrins	“PUFAs oxygenated triènes”
PPAR	“peroxisome proliferator activating response”
PPP	plasma pauvre en plaquettes
PRP	plasma riche en plaquettes
PS	phosphatidylsérine
PtO <sub>2</sub>	oxyde de platine
RCPG	récepteurs couplés à la protéine G
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	“reactive oxygen species”
Rv	résolvine
sLOX	15-lipoxygénase de soja
SM	sphingomyéline
SPM	“specialized pro-resolving mediators”
TMS	“triméthylsilyl”
TNF $\alpha$	“tumor necrosis factor $\alpha$ ”
TX	thromboxanes
VEGF	“vascular endothelial cell growth factor”
vWF	facteur de von Willebrand
SD	déviation standard
SEM	erreur standard relative à la moyenne
5( $\pm$ )-HETE	acide 5( $\pm$ )-hydroxy-eicosa-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -tétraénoïque
5(S)-HpETE	acide 5-hydroperoxy-eicosa-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -tétraénoïque

5(S),12(S)-diHETE	acide 5(S),12(S)- dihydroxy-eicosa-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> - tétraénoïque
5(S),15(S)-diHpETE	acide 5(S),15(S)-dihydroperoxy-eicosa-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,13 <i>E</i> - tétraénoïque
6- <i>trans</i> LTB <sub>4</sub>	acide 5(S),12(R)-dihydroxy-eicosa-6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -tétraénoïque
6- <i>trans</i> -12- <i>épi</i> LTB <sub>4</sub>	acide 5(S),12(S)-dihydroxy-eicosa-6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -tétraénoïque
8(S),15(S)-DiHETE	acide 8(S),15(S)-dihydroxy-eicosa-5 <i>Z</i> ,9 <i>E</i> ,11 <i>Z</i> ,13 <i>E</i> -tétraénoïque
9-HODE	acide 9-hydroxy-octadéca-10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> -diénoïque
12- <i>épi</i> LTB <sub>3</sub>	acide 5(S),12(S)-dihydroxy-eicosa-6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -triénoïque
12- <i>épi</i> LTB <sub>4</sub>	acide 5(S),12(S)-dihydroxy-eicosa-6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -tétraénoïque
12-HETE	acide 12-hydroxy-eicosa-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -tétraénoïque
12-HpETE	acide 12-hydroperoxy-eicosa-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -tétraénoïque
13(±)-HODE	acide 13(±)-hydroxy-octadéca-9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> -diénoïque
13(S)-HpODE	acide 13(S)-hydroperoxy-octadéca-9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> -diénoïque
13(S)-HpOTE	acide 13(S)-hydroperoxy-octadéca-9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> -triénoïque
13(S)-HOTE	acide 13(S)-hydroxy- octadéca-9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> - triénoïque
15(±)-HETE	acide 15(±)-hydroxy-eicosa-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,13 <i>E</i> -tétraénoïque
15-HpETE	acide 15-hydroperoxy-eicosa-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,13 <i>E</i> -tétraénoïque
15(S)-HETrE	acide 15(S)-hydroxy-eicosa-8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,13 <i>E</i> -triénoïque
17(R)-HDoHE	acide 17(R)-hydroxy-docosa-4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i> ,15 <i>E</i> ,19 <i>Z</i> -hexaénoïque
17(S)-H(p)DoHE	acide 17(R)-hydroperoxy- docosa-4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i> ,15 <i>E</i> ,19 <i>Z</i> - hexaénoïque
18(R)-HpEPE	acide 18(R)-hydroperoxy-eicosa-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> ,16 <i>E</i> -pentaénoïque

# INTRODUCTION

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 qui régulent de nombreuses fonctions physiologiques *in vivo* ont été très étudiés au cours de ces dernières années. Il est bien connu que les AGPI à longues chaînes de la série n-3 ont des effets bénéfiques sur les maladies cardiovasculaires (Mozaffarian D & Wu JH, 2011; Kris-Etherton PM *et al.*, 2002), la polyarthrite rhumatoïde (Rennie KL *et al.*, 2003; McCann K, 2007; Venkatraman JT & Chu WC, 1999), le contrôle de la pression artérielle et l'hypertension cardiaque (Holm T *et al.*, 2001 ; Weisinger HS *et al.*, 2001). Les AGPI de la série n-3 peuvent aussi prévenir et réduire la gravité des maladies et jouent des rôles importants dans la prévention de l'athérosclérose et de la maladie d'Alzheimer (James MJ *et al.*, 2000; Furse RK *et al.*, 2001; Song C *et al.*, 2003; Conquer JA *et al.*, 2000). Plus récemment, de nouveaux médiateurs lipidiques dérivés des acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) ont été décrits. Parmi eux, les résolvines sont des molécules oxygénées qui dérivent de l'EPA (série E) et du DHA (série D) (Serhan CN *et al.*, 2000; Serhan CN, 2007; Serhan CN *et al.*, 2008). En plus des résolvines de la série D, le DHA est aussi converti en protectine D1 via un mécanisme qui implique un intermédiaire époxyde (Serhan CN *et al.*, 2006), ainsi qu'en marésine par les macrophages (Serhan CN *et al.*, 2006). Ce composé a été décrit comme étant une molécule anti-inflammatoire puissante sans effet anti-agrégant (Serhan CN *et al.*, 2006; Dona M *et al.*, 2008). En revanche, la protectine DX (PDX), isomère de la PD1, qui dérive du DHA via un mécanisme de dioxygénation, possède des propriétés anti-agrégantes. La PDX inhibe la cyclooxygénase-1 (COX-1) et est un antagoniste du récepteur du thromboxane A<sub>2</sub> (Chen P *et al.*, 2009). Les composés dihydroxylés appelés poxytrines, synthétisées à partir d'AGPIs en C20 et en C22 via la sLOX et qui possèdent le même motif triène conjugué *E,Z,E*, comme la PDX, sont tous des agents anti-agrégants (Chen P *et al.*, 2011).

Cependant, très peu d'études sont disponibles concernant le métabolisme oxygéné de l'acide alpha linoléique (ALA). Pourtant, les études relatives à l'ALA sont particulièrement pertinentes car cet acide gras est consommé en grande quantité (1-2 g/jour chez les adultes humains), ne s'accumule que très peu dans le plasma ce qui suggère un métabolisme très actif. De plus, sa conversion en EPA et DHA est relativement limitée. Une conversion de l'ALA en DHA est de l'ordre de 1% chez les

hommes (Hussein N *et al.*, 2005) et de 2% chez les jeunes femmes (Burdge GC & Wootton SA, 2002).

La formation des isomères de l'acide 9,16-dihydroxy-octadécatriénoïque par la sLOX à partir de l'ALA ont déjà été décrits en 1984 pour la première fois par Feiters *et al.* (Feiters MC *et al.*, 1984). Ces auteurs n'ont pas établi la configuration des doubles liaisons ni la stéréochimie des atomes de carbones asymétriques. D'autres études rapportées par Sok et Kim (Sok DE & Kim MR, 1990; Sok DE & Kim MR, 1994) décrivent quatre isomères mais leur caractérisation n'a pas été entièrement résolue et en particulier celle des isomères tout trans. En 1991, Grechkin *et al.* (Grechkin AN *et al.*, 1991) ont montré que la lipoxygénase des tubercules de pomme de terre qui produit principalement l'acide 9(S)-hydroperoxy-octadéca-10E,12Z,15Z-triénoïque (9(S)-HpOTE) à la différence de la sLOX qui synthétise principalement l'acide 13(S)-hydroperoxy-octadéca-9Z,11E,15Z-triénoïque (13(S)-HpOTE). Les deux isomères (9,16-di-HOTE 10E,12Z,14E) détectés ont bien été caractérisés, mais la stéréochimie du carbone 16 reste indéterminée. Aucun isomère 9,16-di-HOTE tout trans n'a été détecté. En outre les propriétés biologiques de ces dérivés di-hydroxylés n'ont pas encore été étudiées. On sait que dans l'alimentation humaine l'ALA est le plus abondant des AGPI de la série n-3 aussi il est pertinent d'étudier plus à fond son métabolisme oxygéné par sLOX, et de comparer l'activité biologique de ses métabolites à celle de la PDX.

Le travail de cette thèse porte sur la caractérisation complète des métabolites oxygénés dérivés de l'ALA via la sLOX, et sur l'étude de leurs effets anti-inflammatoires et anti-agrégants. Les isomères ont été préparés en incubant l'ALA avec la sLOX.

Dans une première partie nous avons caractérisé leurs structures en utilisant l'HPLC, la GC-MS et la RMN à haut champ. Nous avons ainsi déterminé la position des groupements hydroxyles, la stéréochimie des carbones oxygénés et la géométrie de chaque liaison de leur triène conjugué.

Dans une deuxième partie nous avons montré que les acides 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque et 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-



10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque possédaient des activités biologiques en utilisant des enzymes COXs commerciales et aussi des plaquettes sanguines isolées à partir de sang humain.

Nous avons aussi recherché si ces composés pouvaient être synthétisés par la 15-LOX humaine recombinante de type 2 et étudié les propriétés anti-inflammatoires de ces métabolites en utilisant les globules blancs humains isolés comme modèle. En effet ces cellules possèdent une 5-LOX capable de produire des leucotriènes lorsqu'elles sont activées.

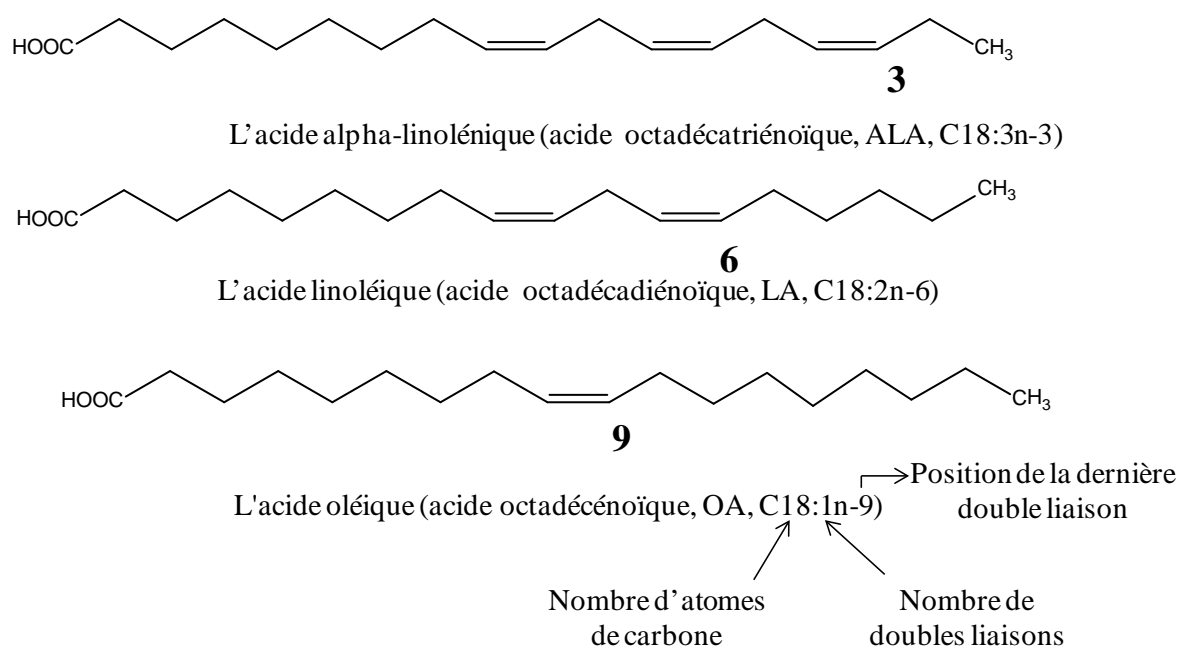
# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## Chapitre 1 :

### Rappels sur les acides gras polyinsaturés et leur métabolisme oxygéné

#### I. Acides gras polyinsaturés (AGPIs)

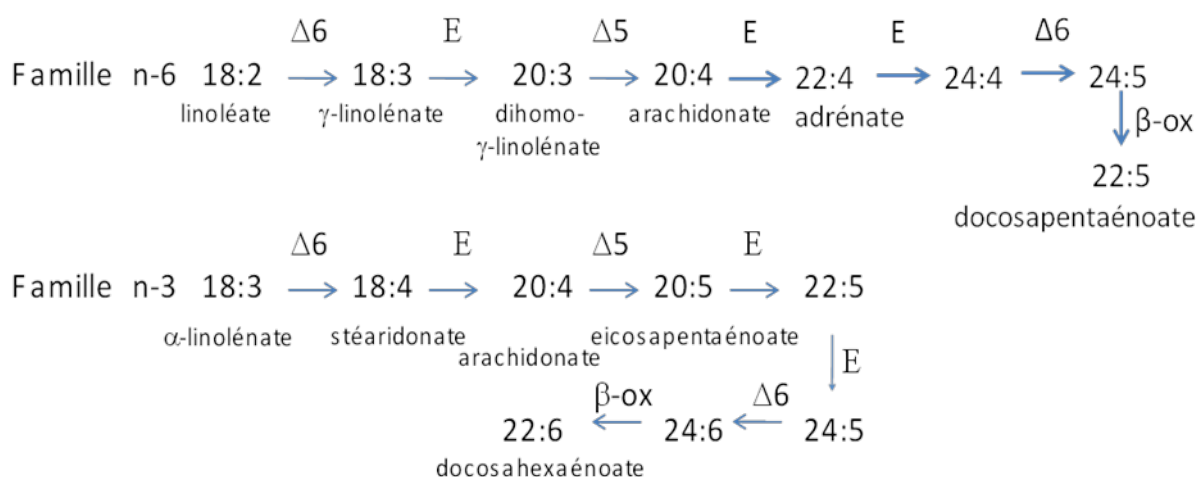
Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique qui sont présents dans les graisses animales, dans les huiles végétales et dans les cires, sous forme d'esters. Le groupement carboxyle (COOH) est porté par le carbone 1. Ils possèdent une chaîne linéaire hydrocarbonée de 4 à 36 atomes, rarement au-delà de 24 carbones. La nomenclature utilisée pour caractériser les acides gras (AG) désigne le nombre d'atomes de carbone et le nombre de doubles liaisons. La famille d'appartenance est donnée par la position de la dernière double liaison par rapport à l'extrémité *N* terminale (groupement méthyle) (Fig. 1). Les AG existent rarement à l'état libre dans la cellule. Ils peuvent être saturés, monoinsaturés avec une double liaison ou polyinsaturés lorsqu'ils possèdent au moins deux doubles liaisons.



**Figure 1: Structure et nomenclature des acide gras polyinsaturés**

Les acides gras polyinsaturés (AGPIs) sont présents dans les membranes biologiques et ont des fonctions importantes notamment comme précurseurs de nombreux composés oxygénés biologiquement actifs.

Il existe deux familles d'AGPI essentiels : n-6 et n-3 encore nommés  $\omega$ -6 et  $\omega$ -3 qui ne sont pas interconvertibles (Fig. 1). Les familles n-6 et n-3 d'AGPIs dérivent respectivement des acides linoléique (LA, 18:2n-6) et  $\alpha$ -linoléique (ALA, 18:3n-3). Ces deux acides gras sont indispensables. Ils ne sont pas synthétisés par l'Homme et doivent être apportés par l'alimentation. Les animaux et l'Homme sont capables de désaturer et d'allonger ces deux acides gras (**Fig. 2**).



**Figure 2: Voies métaboliques des acides gras essentiels**

$\Delta$ , E: étapes catalysées respectivement par une désaturase, une élongase et  $\beta$ -ox :  $\beta$ -oxydation (Vrinten P *et al.*, 2007)

Les processus de désaturation et d'élongation du LA conduisent notamment à la synthèse de l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6). Il est localisé principalement dans les membranes, estérifié en position sn-2 des phospholipides. Il représente environ 25% des acides gras présents dans les membranes (Marcus AJ *et al.*, 1969). Pour être métabolisé en produits actifs, il doit être libéré des phospholipides par une phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) qui hydrolyse principalement les phosphatidyl-cholines (PC) et -éthanolamines (PE) et aussi par une phospholipase C (PLC) qui clive

préférentiellement les phosphatidylinositols (PI) pour former un diglycéride qui est substrat d'une diglycéride lipase (Guichardant M & Lagarde M, 1980; Hofmann SL & Majerus PW, 1982; Hofmann SL & Majerus PW, 1983; Yang HC *et al.*, 1996).

La nature des acides gras présents dans les phospholipides membranaires modifie les propriétés physiques des membranes et notamment leur viscosité et par la même parfois l'activité de certaines protéines membranaires (enzymes, transporteurs, récepteurs). Ils sont également impliqués dans l'activation de certains facteurs de transcription nucléaires, dans la transduction de signaux et dans la production d'eicosanoïdes (Spector AA, 1999).

Les étapes de désaturation et d'élongation de l'ALA conduisent à la formation de deux acides gras majeurs, les acides eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3) que l'on retrouve principalement dans les produits d'origine marine.

## **II. Oxygénation des acides gras polyinsaturés (AGPIs) et notamment de l'acide arachidonique (AA)**

Les AGPIs, et plus particulièrement l'AA, libérés des phospholipides membranaires par l'action des phospholipases peuvent être métabolisés par différentes voies (Needleman P *et al.*, 1986):

- 1) par la voie de la COX qui conduit à la synthèse des prostanoides.
- 2) par la voie des lipoxigénases (LOXs) qui conduit à divers produits bioactifs : biosynthèse des acides hydroperoxy-eicosatétraénoïques (HpETEs), hydroxy-eicosatétraénoïques (HETEs) et des leucotriènes à partir d'AA.
- 3) par des voies mineures : des époxygénases et des cytochromes P<sub>450</sub> oméga- et omega-1-oxygénases qui forment respectivement les acides époxyeicosatétraénoïques 20- et 19-hydroxyeicosatétraénoïque.

## II.1 Voie de la COX

Il existe deux formes principales: une forme constitutive, la COX-1 et une forme inductible, la COX-2.

La COX-1 est une enzyme bifonctionnelle qui possède un groupe hème. Cette protéine constitutive de 70 kDa comporte 600 acides aminés (DeWitt DL & Smith WL, 1988). Elle est codée par un gène porté par le chromosome IX. Elle est fortement exprimée dans les plaquettes sanguines, dans les cellules endothéliales vasculaires, dans l'estomac et dans les reins. Elle est fixée à la membrane du réticulum endoplasmique et à l'enveloppe nucléaire et fonctionne en homo-dimère. Sa structure tridimensionnelle est composée de trois domaines distincts: un domaine de liaison à la membrane composé de quatre hélices  $\alpha$  dans lequel se loge l'AA ou les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS), un domaine EGF-like formé de deux doubles feuillets  $\beta$ , et un domaine catalytique bifonctionnel. Elle est capable de convertir l'AA en endoperoxyde cyclique, la prostaglandine  $G_2$  ( $PGG_2$ ) (activité COX). Cette dernière est ensuite transformée en  $PGH_2$  (activité hydroperoxydase) (DeWitt DL, 1991). Le site actif est composé d'acides aminés essentiels en raison de leurs groupements fonctionnels ou de leurs positions spatiales. L'un d'entre eux la sérine 530 peut être acétylé par l'aspirine, inhibant ainsi son activité (Vane JR *et al.*, 1998)

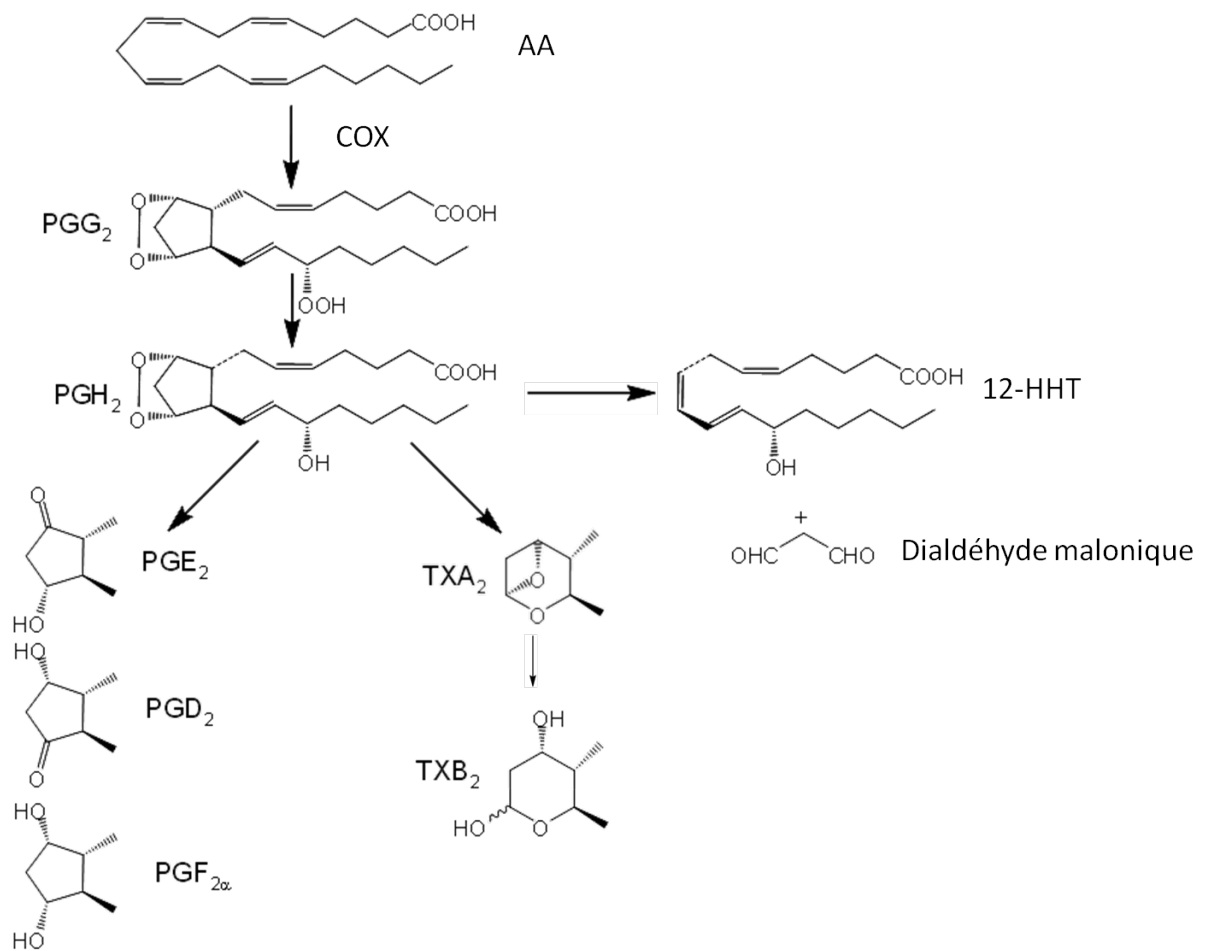
La COX-2 est un site d'action majeur des anti-inflammatoires non stéroïdiens comme l'aspirine et l'indométhacine (Herschman HR, 1999; Raz A *et al.*, 1988). Elle n'est pas présente dans les plaquettes sanguines. La COX-2 est exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires et rénales et au niveau du système nerveux central. Elle est codée par un gène localisé sur le chromosome 1. Elle comporte 604 acides aminés et sa masse molaire est de 70 kDa (Kujubu DA *et al.*, 1991). La COX-2 possède de fortes homologies avec la COX-1: 60% des acides aminés sont identiques. Certaines régions protéiques sont très conservées, en particulier les sites catalytiques (COX et peroxydase). Les principales différences entre les deux isoformes: COX-1 et COX-2, sont la présence d'une extension du côté C-terminal sur COX-2 et d'un site de liaison aux AINS qui est plus grand que celui de la COX-1. De ce fait, la COX-2 n'est que partiellement inhibée par l'aspirine (acétylation de la sérine 516) (Kurumbail RG

*et al.*, 1996). Cette différence entre les sites catalytiques des deux isoformes a été utilisée pour produire des inhibiteurs spécifiques de chacune de ces deux isoformes.

La COX-2 est inductible notamment par les cytokines pro-inflammatoires (Interleukine-1 (IL-1) et par le facteur nucléaire kappa B (NFkB)). Elle joue un rôle essentiel dans la synthèse à long terme des prostanoïdes (Smith WL *et al.*, 1996; Kawaguchi H *et al.*, 1994; Kwon O *et al.*, 2002).

Une COX-3 constitutive a été trouvée au niveau du cerveau. C'est une isoforme de la COX-1 (Chandrasekharan NV *et al.*, 2002) qui est codée par le même gène que la COX-1, avec la différence que la COX-3 conserve un intron qui n'est pas présent dans la COX-1.

Les COXs convertissent l'acide arachidonique en prostanoïdes qui regroupent les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (Tx) (DeWitt DL, 1991) (**Fig. 3**).



**Figure 3: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique - voie de la COX**

La PGH<sub>2</sub> est ensuite métabolisée selon la voie de la prostaglandine synthase, la voie du thromboxane A<sub>2</sub> et la voie de la formation du dialdéhyde malonique

### II.1.1 La voie des prostaglandines

L'endoperoxyde PGH<sub>2</sub> est transformé en prostaglandines E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, I<sub>2</sub> et F<sub>2α</sub> par différentes prostaglandines synthases spécifiques (Halliwell RJ *et al.*, 2004).

Les prostaglandines sont présentes dans la plupart des tissus et organes. Ce sont des médiateurs lipidiques autocrines et paracrines qui agissent entre autres sur les plaquettes sanguines, l'endothélium, l'utérus et les mastocytes. Elles agissent sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. L'activation des protéines G peut



activer ou inhiber la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) selon le type de cellules. Cette activation peut aussi activer la voie de signalisation des phosphoinositols et ainsi induire la libération du calcium intracellulaire. D'autres agissent sur des récepteurs nucléaires au niveau du noyau en activant le ligand "peroxisome proliferator activating response" (PPAR) et aussi des facteurs de transcription comme par exemple: l'activation de la protéine-1 (AP-1), du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT), NFkB (Alfranca A *et al.*, 2006).

Les prostaglandines E<sub>2</sub> et D<sub>2</sub> sont utilisées comme marqueurs de l'inflammation. En effet, ces deux prostaglandines sont formées à partir de l'acide arachidonique par l'activation de la COX-1 mais surtout de la COX-2 qui est surexprimée en réponse aux cytokines lors de l'inflammation (Singer II *et al.*, 1998). Ainsi par exemple la COX-2 est exprimée à la surface des cellules épithéliales ainsi que dans les cellules immunitaires de la lamina propria de patients atteints au cours des périodes actives d'inflammation (Hendel J & Nielsen OH, 1997; Singer II *et al.*, 1998). Elle est également induite dans les modèles expérimentaux d'inflammation colique (Wang L *et al.*, 2008). L'augmentation de la COX-2 lors de l'inflammation aiguë se traduit par une augmentation du taux de PGE<sub>2</sub> (Okayama M *et al.*, 2007; Sheibanie AF *et al.*, 2007). Les prostanoides sont impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques comme: la modulation des réactions inflammatoires, l'ulcération gastrointestinale, l'angiogenèse (Wang L *et al.*, 2008).

La PGE<sub>2</sub> exerce des activités pro-inflammatoires interviennent dans la formation de tumeurs, l'artériosclérose, l'induction de la fièvre et la suppression de la douleur. Elle active des récepteurs présents dans les fibroblastes synoviaux et augmente l'expression d'un facteur d'angiogénèse puissant "vascular endothelial cell growth factor" (VEGF) (Ben-Av P *et al.*, 1995). La PGE<sub>2</sub> facilite l'initiation de la thrombose artérielle et aggrave l'athéromatose en activant EP3 qui est l'un des quatre types de récepteurs de la PGE<sub>2</sub> présents sur les plaquettes sanguines, impliqués dans l'agrégation plaquettaire (Gross S *et al.*, 2007).

Cependant, la PGE<sub>2</sub> présente parfois des propriétés anti-inflammatoires via la stimulation de l'AMPc (Kast RE, 2001) et/ou en inhibant la production de certaines interleukines et d'autres cytokines et en supprimant la prolifération des lymphocytes

(Menger MD & Vollmar B, 2004). Elle inhibe également l'action de la 5-LOX et diminue la synthèse des leucotriènes (Harizi H *et al.*, 2003) et stimule l'activité des lipoxines anti-inflammatoires. Ainsi la PGE<sub>2</sub> joue un rôle dans la genèse de hypertrophie du ventricule gauche (Frias MA *et al.*, 2007) et a un rôle protecteur contre l'ischémie myocardique (Xiao CY *et al.*, 2004; Degousee N *et al.*, 2008)

### **II.1.2 La voie du thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>):**

Le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) est un puissant inducteur de la vasoconstriction et de l'agrégation plaquettaire (Majerus PW, 1983). Il est formé via l'action de la thromboxane synthase à partir de la prostaglandine H<sub>2</sub> (voir **Fig. 3**). Cette enzyme bifonctionnelle possède un cytochrome P450, un ligand thiolate, un domaine de liaison à l'oxygène ainsi qu'un domaine permettant la liaison d'un ligand hydrophobe (Hsu PY *et al.*, 1999). Elle catalyse aussi la production d'un acide gras hydroxylé, l'acide 12(S)-hydroxy-heptadéca-5Z,8E,10E-triénoïque (HHT) qui inhibe l'agrégation plaquettaire (Croset M & Lagarde M, 1983) et du dialdéhyde malonique (MDA) par coupure du cycle cyclopentane de la PGH<sub>2</sub>.

Le TXA<sub>2</sub> est très instable avec une durée de vie 30 secondes en solution aqueuse, Il est hydrolysé en thromboxane B<sub>2</sub>, biologiquement inactif. Il est aussi impliqué dans la modulation de la cytotoxicité des cellules, dans la croissance des tumeurs et des métastases, dans l'athérogénèse et la néovascularisation (Nakahata N, 2008).

Le TXA<sub>2</sub> est produit par les thrombocytes (plaquettes sanguines) activés et est doté de propriétés prothrombiques : il stimule l'activation de nouveaux thrombocytes en augmentant l'agrégation plaquettaire et est aussi impliqué dans les mécanismes d'adhésion des plaquettes avec les neutrophiles (Chlopicki S *et al.*, 2003).

Le TXA<sub>2</sub> est aussi un vasoconstricteur qui joue un rôle important dans l'inflammation des tissus blessés. Il est également considéré comme responsable de l'angor (Ohmori M *et al.*, 1987).

## II.2 Voie des LOXs

### II.2.1 Mécanisme général des LOXs

Les LOXs sont des protéines enzymatiques constituées de 665 acides aminés (76 kDa). Elles contiennent un atome de fer non hémunique fixé à des résidus histidine et isoleucine (Kühn H *et al.*, 2005). Elles sont naturellement présentes dans les plantes et les animaux (Mack AJ *et al.*, 1987; Brash AR *et al.*, 1997; Grechkin A, 1998; Kühn H & Thiele BJ, 1999). Leur implication dans les mécanismes d'oxydation est connue chez les plantes depuis plus de 70 ans (André E & Hou K, 1932). La voie de la LOX chez les plantes est équivalente à celle de l'AA chez les animaux (Helmer ME *et al.*, 1979; Buchanan MR *et al.*, 1985; Buchanan MR *et al.*, 1986; Grossi IM *et al.*, 1989; Benincasa C *et al.*, 2003). Cette voie est activée par une blessure ou à une agression des tissus par des pathogènes ou par un stress chimique ou mécanique.

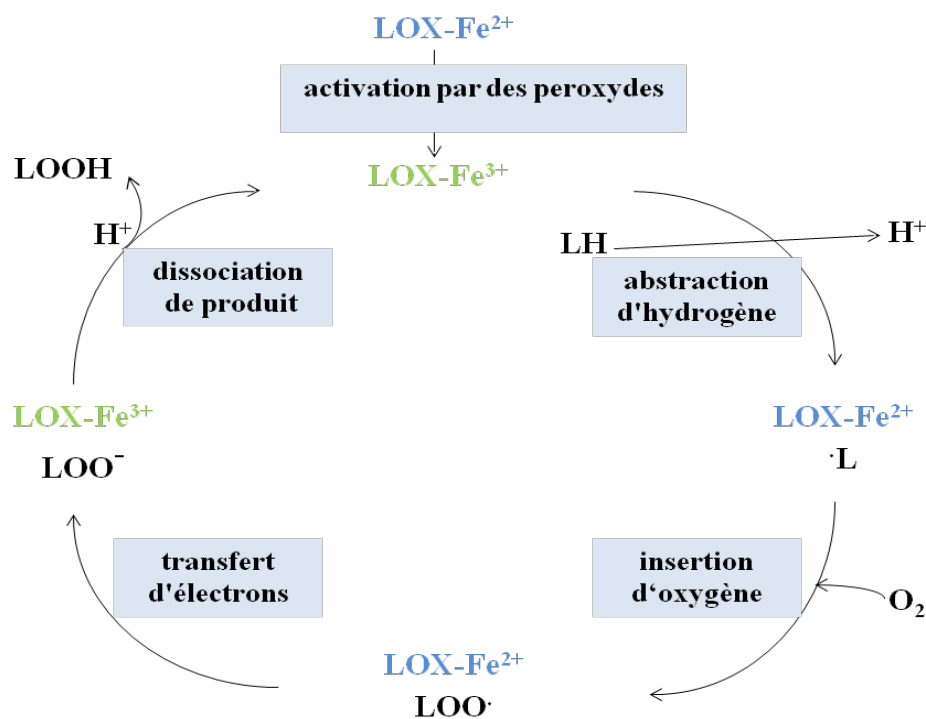
Elles sont spécifiques. Ainsi elles fixent une molécule d'oxygène sur les carbones C5 (5-LOX), C12 (12-LOX) ou C15 (15-LOX) de l'AA (Spector AA *et al.*, 1988; Kühn H & Thiele BJ, 1999). Les LOX sont généralement cytosoliques. Elles catalysent la peroxydation des AGPIs ayant au moins un motif 1,4-cis, cis-pentadiène et forment une large variété de composés (Hamberg M, 1980). Les LOX acceptent comme substrats les AGPIs libres ou estérifiés dans les phospholipides membranaires ou présents dans les lipoprotéines ou dans les endocannabinoïdes (Woodward DF *et al.*, 2008).

Le mécanisme d'action des LOX est divisé en trois étapes (Kühn H & Thiele BJ, 1999; Kühn H & Borchet A, 2002) (**Fig. 4**).

- **1** Il est initié par un atome de fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du site actif de la LOX qui capture un électron d'un groupe méthylène bis allylique appartenant à une structure 1-cis,4-cis-pentadiène d'un AGPIs. Ce dernier cède alors un proton à un groupe basique de l'enzyme et devient un radical alkyle. La stéréospécificité de l'abstraction (R ou S) dépend de l'enzyme. Les LOX animales ont généralement une stéréospécificité S.

- 2 Après réarrangement, l' $O_2$  s'additionne à ce radical alkyle libre pour former un radical hydroperoxyde caractérisé par la présence d'un diène conjugué cis-trans qui absorbe à  $\lambda_{max}$  235 nm.

- 3 Le radical hydroperoxyde formé est ensuite réduit sous forme hydroperoxyde et l'enzyme est régénérée sous forme active. L'hydroperoxyde est ensuite normalement réduit par la glutathion peroxydase en acide gras mono-hydroxylé correspondant. Cette enzyme requiert du sélénium comme cofacteur et du glutathion comme coenzyme.



**Figure 4: Métabolisme oxygéné des acides gras polyinsaturés par les LOXs**

$LH$  = acides gras polyinsaturés,  $L\cdot$  = radical alkyle;  $LOO\cdot$  = radical peroxyde. Le fer non hémunique change de valence au cours de la réaction (Kühn H & Borchet A, 2002).

## II.2.2 Voie de la 12- LOX

Les 12-LOX ont été découvertes pour la première fois chez l'animal dans les plaquettes sanguines humaines (Hamberg M & Samuelsson B, 1974) et bovines (Nugteren DH, 1975). Elles sont distribuées dans de nombreux tissus tels que le cerveau, l'hypothalamus, l'hippocampe et la ganglia de certains mammifères (Yamamoto S, 1992). Elles sont impliquées dans de nombreuses maladies comme les syndromes myéloprolifératifs, l'hypertension artérielle, l'hypertrophie prostatique maligne, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde et le cancer de l'utérus. Les patients avec un déficit de 12-LOX ont tendance à avoir des épisodes hémorragiques (Yoshimoto T & Takahashi Y, 2002).

Il existe deux isoformes de 12-LOX chez les mammifères: la 12(S)-LOX plaquettaire (Chen XS *et al.*, 1994) et la 12(S)-LOX leucocytaire (Yoshimoto T & Takahashi Y, 2002). Trois nouvelles isoformes ont été découvertes dans l'épiderme : une 12(S)-LOX (Kinzig A *et al.*, 1997), une LOX-3 (uniquement chez la souris) et une 12(R)-LOX (Sun D *et al.*, 1988; Fürstenberger G *et al.*, 2007).

La 12(S)-LOX plaquettaire est présente essentiellement dans les plaquettes et l'épiderme (Hamberg M & Samuelsson B, 1974; Nugteren DH, 1975). Elle est localisée dans le cytoplasme et aussi dans les microsomes des kératinocytes. Elle est transloquée à la membrane lors de l'activation des plaquettes (Ozeki Y *et al.*, 1999; Funk CD *et al.*, 1992; Yoshimoto T & Takahashi Y, 2002).

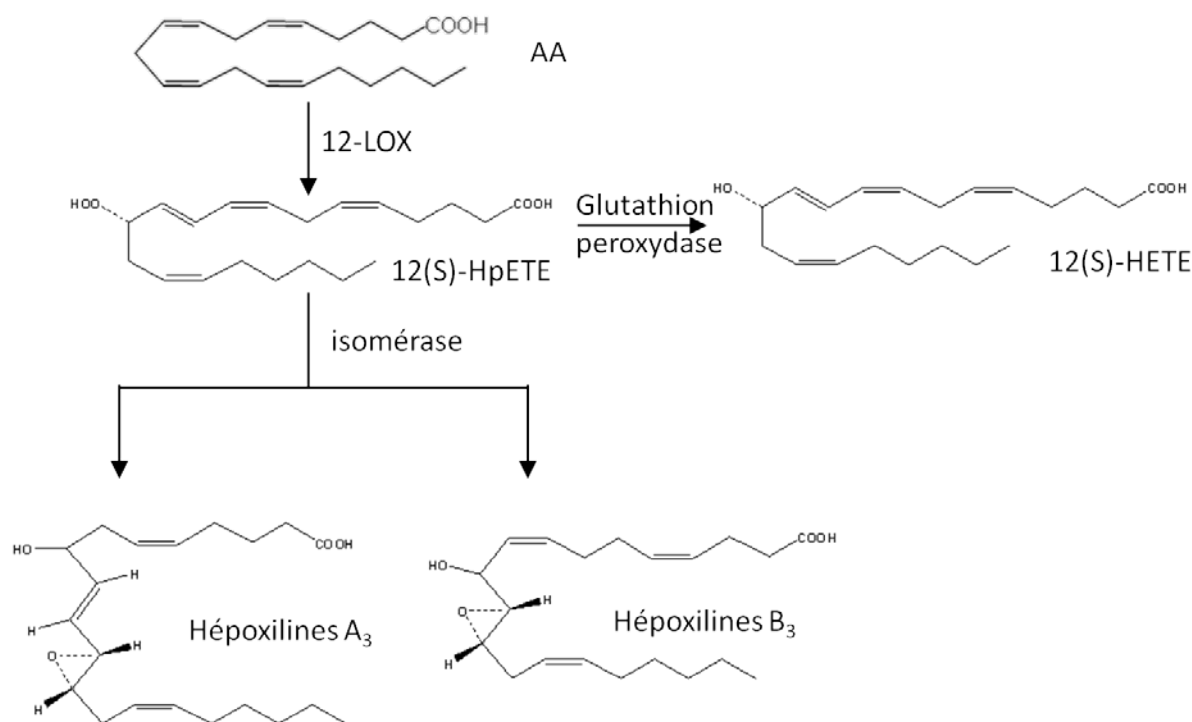
La 12-LOX utilise préférentiellement l'AA comme substrat. Elle catalyse la fixation d'une molécule d'oxygène sur le carbone 12 de l'AA et convertit l'AA en acide 12(S)-hydroperoxy-eicosatétraénoïque (12-HpETE) qui est normalement réduit en acide 12(S)-hydroxy-eicosatétraénoïque (12-HETE) par la glutathion peroxydase. La 12-LOX est activée par de faibles quantités d'hydroperoxydes lipidiques (Kühn H & Borchert A, 2002). Le métabolisme oxygéné de l'AA via la 12-LOX est présenté dans la Figure 5 (**Fig. 5**). Le 12-HpETE et le 12-HETE ont des actions variables sur l'agrégation plaquettaire. Ils ont été considérés comme des inhibiteurs de l'agrégation

induite par les PGG<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> et par le TXA<sub>2</sub> (Croset M & Lagarde M, 1983). Le 12-HpETE active sa propre synthèse en augmentant l'activité de la 12-LOX plaquettaire humaine (Croset M & Lagarde M, 1985). Il a été également montré que de fortes concentrations d'hydroperoxydes lipidiques (5 μM) inhibent la COX (Siegel MI *et al.*, 1979) tandis que de faibles concentrations (1 μM) l'activent (Calzada C *et al.*, 1997). En cas de déficience en glutathion et/ou en présence d'hémine, des hépoxilines (HXs): l'hépoxilines A<sub>3</sub> (HXA<sub>3</sub>) (acide 8(±)-hydroxy-11(S),12(S)-époxy-eicosa-5Z,9E,14Z-triénoïque) et B<sub>3</sub> (acide 10(±)-hydroxy-11(S),12(S)-époxy-eicosa-5Z,8Z,14Z-triénoïque) (Pace-Asciak CR *et al.*, 1983), peuvent être formées à partir du 12-H(p)ETE. Les HXs sont des acides gras mono-hydroxylés époxydés. Elles ont des propriétés pro-inflammatoires dans la peau, et anti-inflammatoire dans les neutrophiles polynucléaires. En outre, la HXA<sub>3</sub> synthétisée en réponse à une infection bactérienne est maintenant connue pour être un important régulateur de l'inflammation des muqueuses. (Nigam S *et al.*, 2007) (**Fig. 5**).

La 12(S)-LOX leucocytaire est similaire à la 15-LOX-1 (voir § **II.2.3**). On la trouve chez la souris, le rat, le lapin, le chien, le porc et le veau. L'Homme n'exprime pas cette 12-LOX particulière, mais possède une 15-LOX-1 (Yoshimoto T & Takahashi Y, 2002). La 12(S)-LOX leucocytaire a été très étudiée. Elle intervient dans les processus d'oxydation des lipoprotéines de basse densité "low density lipoprotein" (LDL) qui conduit à l'athérosclérose (Takahashi Y *et al.*, 2005).

La 12(R)-LOX et la 12(S)-LOX de l'épiderme jouent un rôle dans la protection de la peau des mammifères. Elles sont exprimées dans la peau des murins et sont peu efficaces comparées à celles des plaquettes. Elles préfèrent les esters méthyliques de l'AA et de l'acide linoléique (LA) comme substrat. Elles sont capables de convertir l'AA en 12-HETE et LA en acide 13-hydroxyperoxy-octadécadiénoïque (13-HpODE) (Siebert M *et al.*, 2001). La 12(R)-LOX joue un rôle dans l'expression de MUC5AC (une mucine importante des voies respiratoires) par les cellules épithéliales respiratoires (Garcia-Verdugo I *et al.*, 2012). La 12(R)-LOX est aussi localisée dans la peau psoriasique et les amygdales, le poumon, les testicules, les glandes surrénales,

l'ovaire et la prostate. Elle est très active dans le psoriasis et dans les dermatoses prolifératives (Baer AN *et al.*, 1995; Boeglin WE *et al.*, 1998). Son expression est diminuée dans les tumeurs épidermiques chez des souris Naval Medical Research Institute (NMRI) (Müller K *et al.*, 2002).



**Figure 5: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique- voie de la 12-LOX conduisant à la synthèse des hépoxilines**

### II.2.3 Voie de la 15-LOX

Il existe deux isoformes de 15-LOX (15-LOX-1 et 15-LOX-2). Elles sont présentes dans de nombreuses cellules, telles que les réticulocytes, leucocytes, monocytes, macrophages, cellules épithéliales. La structure de la 15-LOX de lapin cristallisée a été élucidée (Stinson AM *et al.*, 1991; Gillmor SA *et al.*, 1997). Elles

possèdent en position C-terminale un grand domaine catalytique contenant du fer non hémique et un petit domaine en tonneau bêta à l'extrémité N-terminale. Le site catalytique renferme des acides aminés hydrophobes qui interagissent avec le substrat et déterminent la spécificité de l'enzyme. Leur remplacement par des acides aminés avec des chaînes moins encombrantes, comme l'alanine, transforme la 15-LOX en une enzyme fonctionnant comme une 12-LOX (Sloane DL *et al.*, 1991; Borngräber S *et al.*, 1999). A l'entrée du site actif, on trouve aussi de l'arginine positivement chargée qui interagirait avec le groupement carboxylique de l'acide gras (Gan QF *et al.*, 1996). La 15-LOX transforme l'AA en acide 15(S)-hydroperoxy-eicosatétraénoïque (15(S)-HpETE) qui est le précurseur des lipoxines et l'acide linoléique (LA) en acide 13(S)-hydroperoxy-octadécadiénoïque (13(S)-HpODE) qui est ensuite réduit.

La 15-LOX-1 joue un rôle dans la disparition des mitochondries et des autres organelles des réticulocytes (Pallast S *et al.*, 2009). Elle est exprimée aussi dans les éosinophiles, les macrophages, les cellules de l'épithélium trachéobronchial, la peau et le colon (Funk CD, 1996; Kamitani H *et al.*, 1998). Elle est impliquée dans plusieurs types de cancer comme celui de la prostate où elle métabolise préférentiellement LA plutôt que l'AA. Ainsi on retrouve beaucoup de 13(S)-HODE dans le cancer de la prostate (Kelavkar U *et al.*, 2006; O'Flaherty JT *et al.*, 2012).

La 15-LOX-2 est une LOX qui a été clonée à partir de radicelles de cheveux humains (Brash AR *et al.*, 1997). Sa séquence présente seulement 40% d'identité avec celle de la 15-LOX-1. En revanche, elle convertit préférentiellement l'AA plutôt que le LA et synthétise principalement du 15-HpETE. Le métabolite (acide 15-hydroxy-eicosatétraénoïque (15-HETE)) qui est souvent absent dans le cancer de la prostate sert d'indicateur de la sévérité de la maladie (Brash AR *et al.*, 1999; Jack GS *et al.*, 2000; Kelavkar U *et al.*, 2006)

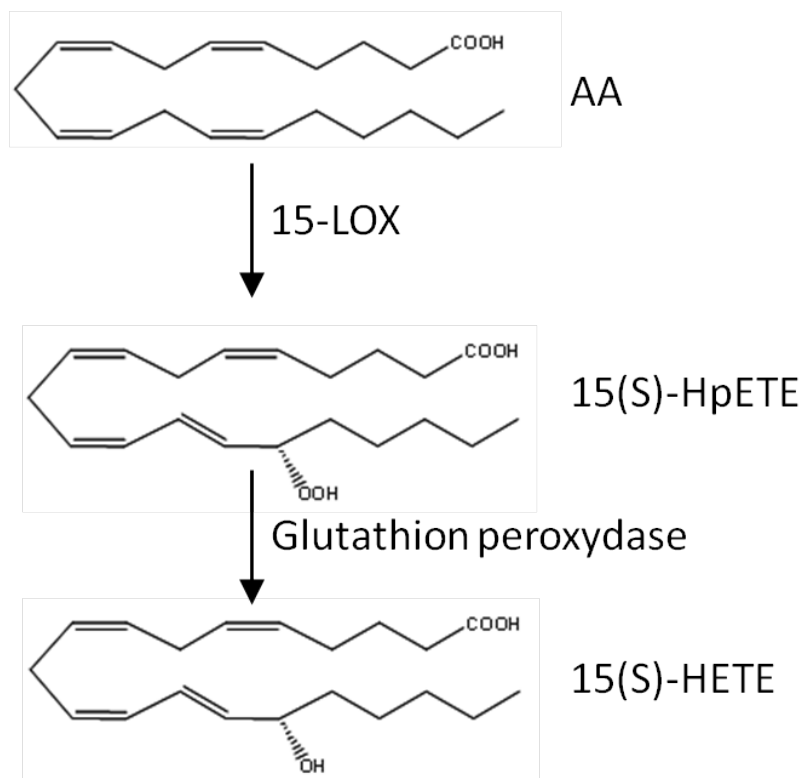
### **La 15-lipoxygénase de soja**

La 15-lipoxygénase de soja (sLOX), découverte en 1932, contient au moins 4 isoenzymes : L-1, L-2, L-3a et L-3b (Andre E & Hou KW, 1932; Fauconnier ML & Marlier M, 1997). Trois nouvelles isoenzymes (L-4, L-5, L-6) ont été isolées à partir de graines germées (Kato T *et al.*, 1992).



L'isoforme L-1 se différencie facilement des autres isoformes du fait de son pH optimum qui est de 9-9,5 au lieu de 6-7. Elle est spécifique de la position n-6 tandis que les autres isoformes L-2 et L3 sont moins spécifiques. Elle produit à partir de l'acide linoléique majoritairement des dérivés 13-hydroperoxydes (97,5% à pH 9) en insérant une molécule d'oxygène en position n-6 de la chaîne mais aussi des 9-hydroperoxydes produits (25% à pH 6) (oxygénation en position n-9). Cette faible spécificité est confirmée par le fait que ces LOXs sont capables de faire des dioxygénations. Ainsi la LOX-1 de soja est capable de former de l'acide 5(S),15(S)-dihydroperoxy-6E,8Z,11Z,13E-eicosatétraénoïque (5(S),15(S)-diHpETE) à partir de l'AA (Bild GS *et al.*, 1977). Cette sLOX-1 est utilisée comme modèle pour la 15-LOX humaine en raison de leurs similitudes mécanistiques dans le métabolisme de l'AA avec la production de 15-HpETE, et de leurs grandes similitudes structurelles à la fois dans les domaines hélice alpha (catalytique) et du tonneau bêta (association aux membranes) (Prigge ST *et al.*, 1996; Minor W *et al.*, 1996). En outre, la sLOX-1 utilise préférentiellement l'AA plutôt que LA (Weckslar AT *et al.*, 2008; Ruddat VC *et al.*, 2004).

Les hydroperoxydes obtenus sont ensuite réduits en acide gras mono-hydroxylés correspondants par la glutathion peroxydase (**Fig. 6**).



**Figure 6: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique - voie de la 15-LOX**

## II.2.4 Voie de la 5-LOX

La 5-LOX contient un atome de fer non hémérique lié à 3 résidus histidine. Elle catalyse la formation des leucotriènes (LTs) et est une cible d'intervention pharmaceutique dans un certain nombre de maladies. Les LTs sont de puissants médiateurs de l'inflammation et des réactions allergiques (Ford-Hutchinson AW *et al.*, 1980; Werz O, 2002 ; Murphy RC & Gijón MA, 2007).

La 5-LOX est activée par la protéine "5-lipoxygenase-activating protein" (FLAP) de 18 kDa qui est liée et transloquée du cytoplasme à la membrane. La FLAP facilite la liaison des AGPIs à la 5-LOX (Plante H *et al.*, 2006)

La 5-LOX métabolise l'AA en l'acide 5-hydroperoxy-eicosatétraénoïque (5(S)-HpETE) en insérant une molécule d'oxygène sur le carbone 5 de l'AA. Le 5(S)-HpETE peut être réduit en acide 5(S)-hydroxy-eicosatétraénoïque (5(S)-HETE) *via* la glutathion peroxydase ou déshydraté en acide 5(S),6(S)-époxy-eicosa-7E,9E,11Z,14Z-

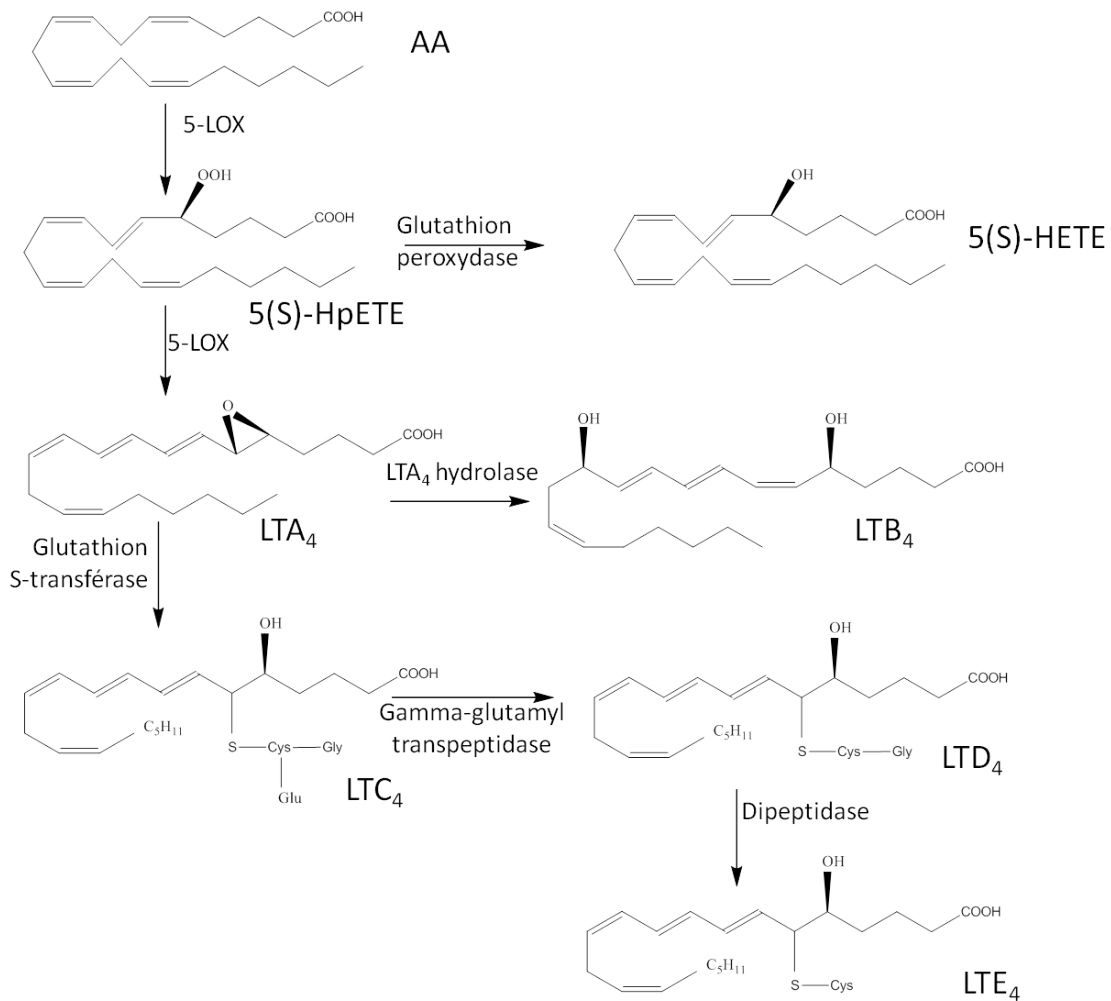
tétraénoïque ou leucotriène A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) qui est instable (demi-vie de 10 sec) (Rådmark O *et al.*, 1980).

Le LTA<sub>4</sub> est alors rapidement converti en leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) et en leucotriène C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) selon deux voies enzymatiques (**Fig. 7**) :

1) la voie de la LTA<sub>4</sub> hydroxylase qui hydrolyse l'époxyde et conduit à la formation de l'acide 5(S),12(R)-dihydroxy-eicosa-6Z,8E,10E,14Z-tétraénoïque ou leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>).

2) la voie de la LTC<sub>4</sub> synthase (ou glutathion transférase II) qui fixe un glutathion Glu-Cys-Gly sur le carbone 6 du LTB<sub>4</sub>.

Le résidu glutamate du glutathion fixé sur le LTC<sub>4</sub> est ensuite clivé par la  $\gamma$ -glutamyltransférase pour former le leucotriène D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>). LTE<sub>4</sub> dérive du LTD<sub>4</sub> par la perte du résidu glycine (Lewis RA *et al.*, 1990).



**Figure 7: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique - voie de la 5-LOX**

La 5-LOX peut aussi métaboliser l'AA en lipoxines (LXs) (voir Fig. 9 dans § III.1).

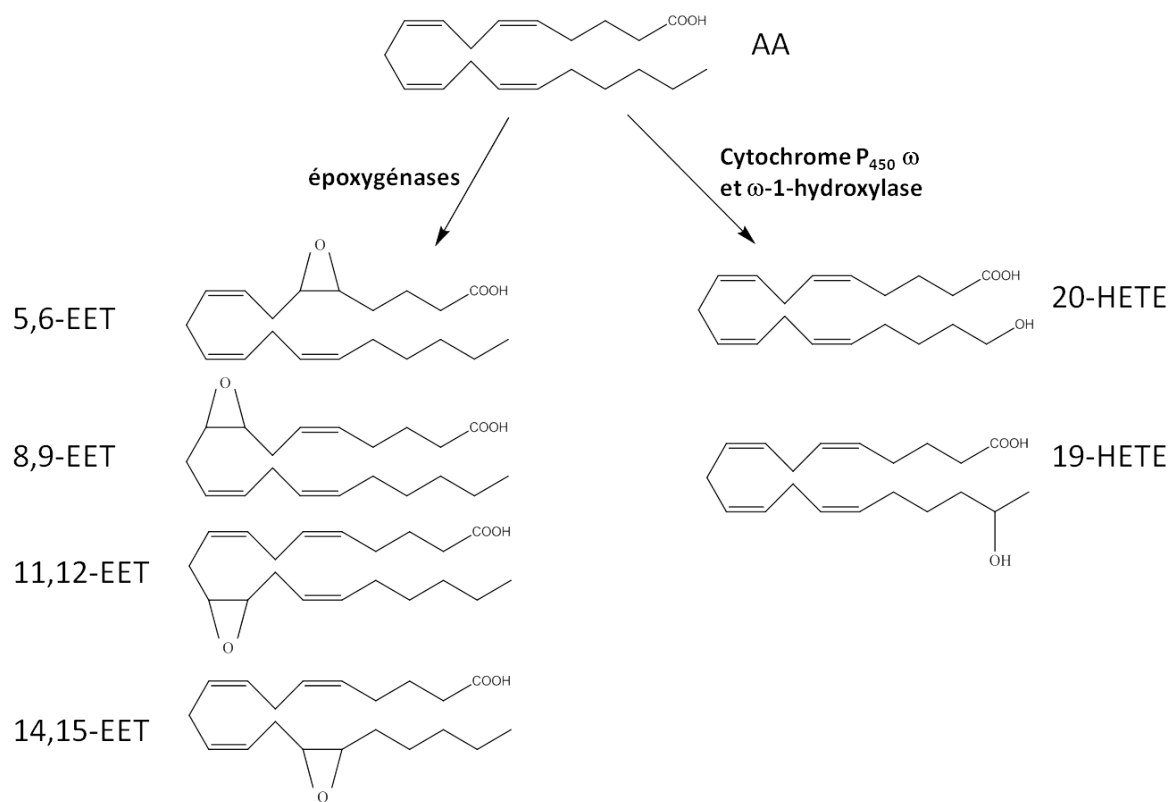
## II.2.5 La voie des époxygénases et des cytochromes P450 $\omega$ -ou $\omega$ -1-oxygénases

Les époxygénases sont des hémoprotéines qui catalysent une monooxygénation à partir du dioxygène (un atome d'oxygène est transféré sur l'acide gras et l'autre est réduit en eau). Les cytochromes P<sub>450</sub> sont localisés principalement dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries.

Les époxygénases sont des enzymes dont la principale fonction est de catalyser la formation d'époxydes (**Fig. 8**). Les acides époxy-eicosatriénoïques (EETs) synthétisés à partir d'AA sont ensuite hydrolysés par des époxydes hydrolases en acides dihydroxy-eicosatriénoïques. Quatre acides époxy-eicosatriénoïques (5,6-, 8,9-, 11,12-, et 14,15-EETs) ont été décrits par Spector A.A (Spector AA, 2009).

L'AA peut aussi être métabolisé par les cytochrome-P<sub>450</sub>  $\omega$ -ou  $\omega$ -1-oxygénases respectivement en acide 20-hydroxy-eicosatétraénoïque (20-HETE) ou 19-hydroxy-eicosatétraénoïque (19-HETE) (Schwartzman ML *et al.*, 1986; Takahashi K *et al.*, 1990).

Les époxydes formés par les époxygénases sont des médiateurs lipidiques capables d'affecter les processus cellulaires de façon aiguë ou chronique.



**Figure 8: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique - La voie des époxygénases et des cytochromes P450 ω-ou ω-1-oxygénases**

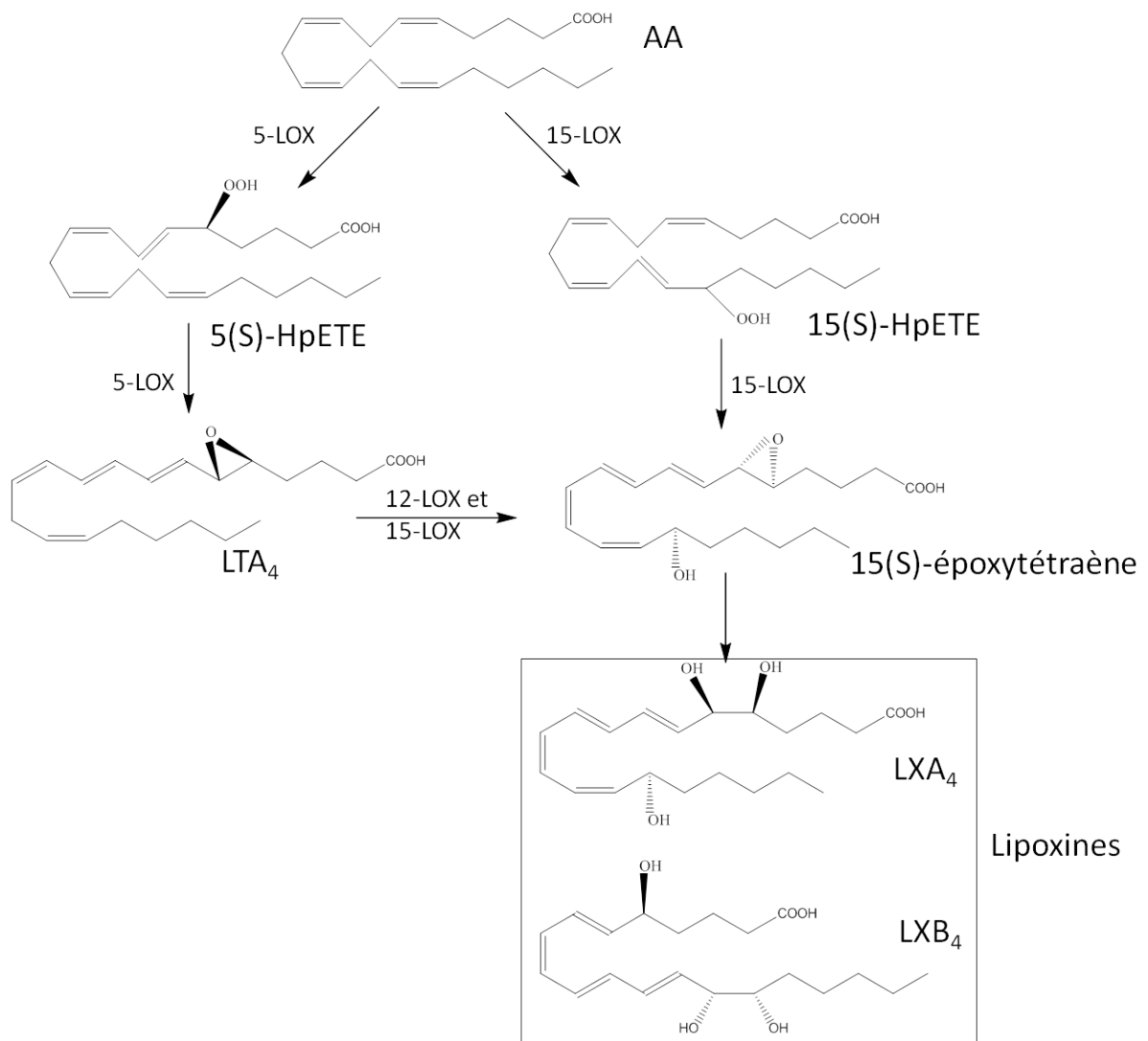
### III. Métabolites oxygénés particuliers: les “specialized pro-resolving mediators” (SPM)

De nouveaux médiateurs lipidiques dérivés des acides gras polyinsaturés ont été récemment identifiés. Ils contrôlent la réponse inflammatoire aiguë en activant des programmes de résolution locale. Ces médiateurs spécialisés dans la pré-résolution des phénomènes inflammatoires “specialized pro-resolving mediators” (SPM) possèdent deux grandes fonctions: ils contrôlent l’inflammation auto-limitée et promeuvent la résolution en temps opportun (Recchiuti A & Serhan CN, 2012). Les SPM comprennent les lipoxines (LX), les résolvines (Rv), les protectines (PD) et les maresines (MaR). Ils sont tous synthétisés enzymatiquement lors de la résolution de l’inflammation et ont des propriétés anti-inflammatoires.

#### III.1 Les lipoxines

Les lipoxines (LX), décrites par Serhan, sont des acides gras trihydroxylés dérivés de l'AA qui possèdent quatre doubles liaisons conjuguées (Serhan CN *et al.*, 1984). Leur synthèse implique l’intervention consécutive de deux LOXs.

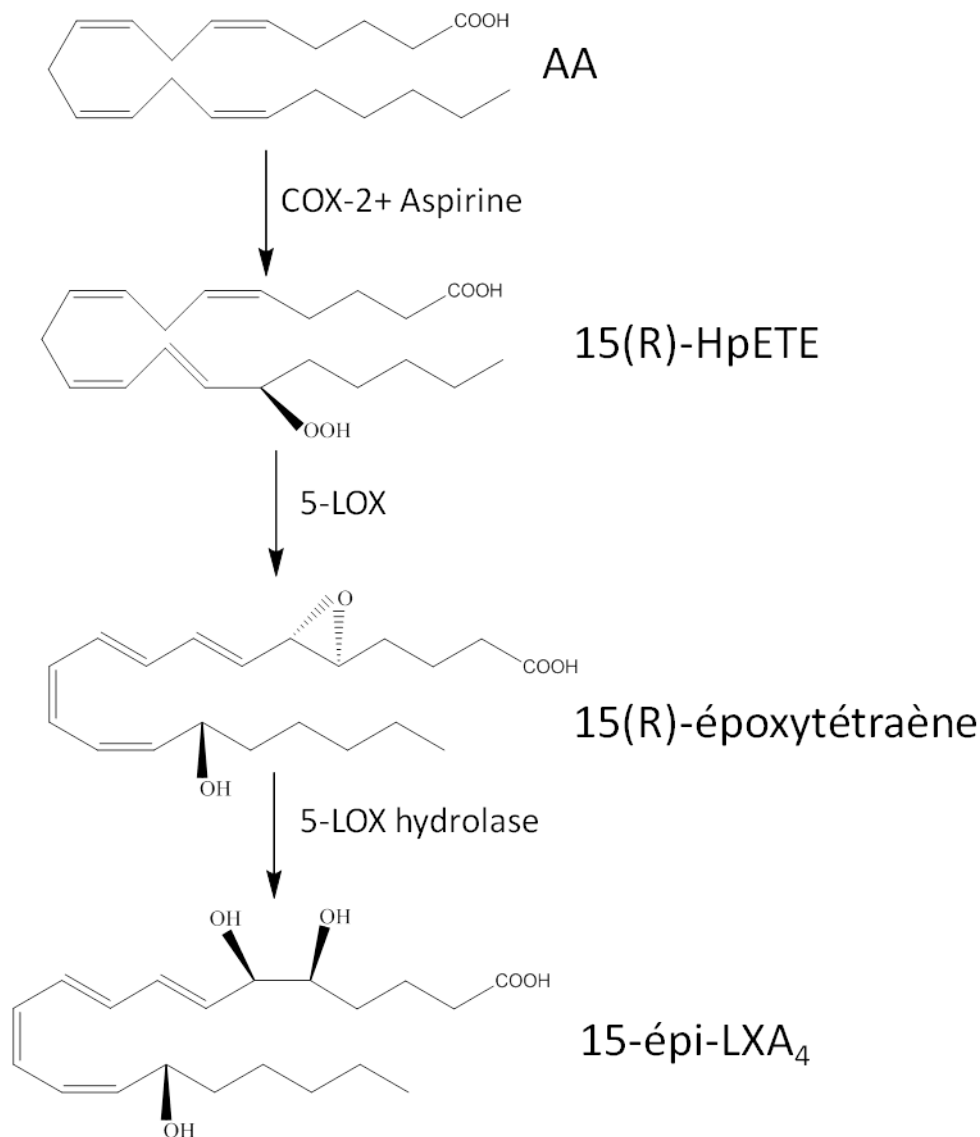
L’AA est transformé via la 15-LOX en acide 15-hydroperoxy-eicosatétraénoïque (15-HpETE) ou via la 5-LOX en acide 5-hydroperoxy-eicosatétraénoïque (5-HpETE) qui sont ensuite convertis en LTA<sub>4</sub> via par la 5-LOX. Le LTA<sub>4</sub> est ensuite transformé en l’acide-5(S),6(S)-époxy-15(S)-hydroxy-eicosatétraénoïque par la 12- et/ou la 15-LOX. Cet intermédiaire peut aussi être formé directement à partir du 15-HpETE via la 5-LOX. Il est ensuite métabolisé par des hydrolases spécifiques en lipoxine A<sub>4</sub> ou acide 5(S),6(R),15(S)-trihydroxy-eicosa-7E,9E,11Z,13E-tétraénoïque ou en lipoxine B<sub>4</sub> ou acide 5(S),14(R),15(S)-trihydroxy-eicosa-6E,8Z,10E,12E-tétraénoïque (**Fig. 9**).



**Figure 9: Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique conduisant à la synthèse des lipoxines (Serhan CN *et al.*, 1984)**

Une autre voie de biosynthèse des LX transcellulaires a été identifiée (Clària J & Serhan CN, 1995). Cette voie implique la COX-2 acétylée qui convertit l'AA en 15(R)-HpETE qui ensuite hydrolysé par la 5-LOX en 15-épi-lipoxine A<sub>4</sub> ou acide 5(S),6(R),15(R)-trihydroxy-eicosa-7E,9,E,11Z,13E-tétraénoïque (**Fig. 10**).





**Figure 10: Schéma montrant la voie de la 15-épi-LXA<sub>4</sub>** (Clària J & Serhan CN, 1995)

Le mécanisme de biosynthèse transcellulaire joue un rôle clé dans leur production. Ainsi, les lipoxines peuvent être formées à partir du LTA<sub>4</sub> produit par les neutrophiles et les LXB<sub>4</sub> via l'action de la 15/12-LOX plaquettaire.

Les lipoxines dérivées de l'AA ont des propriétés anti-inflammatoires. Elles stimulent la génération de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et la dégranulation à des concentrations submicromolaires. Elles sont aussi puissantes que le LTB<sub>4</sub>. Elles stimulent aussi le chimiotactisme des leucocytes polynucléaires (PMN) et la

mobilisation du calcium (Chiang N *et al.*, 2005). Elles contrôlent la résolution de l'inflammation dans des pathologies telles que l'asthme, l'arthrite, les troubles cardiovasculaires et les affections gastro-intestinales. Elles jouent un rôle de régulateur dans la réponse immunitaire provoquée par une infection parasitaire (Serhan CN, 2005). Des analogues stables, synthétiques de LXs et la 15-épi-LXA<sub>4s</sub> sont utilisés comme anti-inflammatoires (McMahon B *et al.*, 2001).

### III.2 Les résolvines (Rv)

Le terme “résolvine” (Rv) a été proposé par Serhan CN et son équipe. Ces composés ont été découverts dans les exsudats inflammatoires lors de la phase de résolution (Serhan CN *et al.*, 2000). Les résolvines sont des molécules di- et tri-hydroxylées formées à partir des AG de la série n-3. Elles sont produites par la COX-2 et permettent de diminuer, de prévenir ou d'éliminer les phénomènes inflammatoires et la migration des PMN ainsi que la production d'interleukine-12 (Serhan CN *et al.*, 2002). Les composés dérivés de l'EPA et du DHA sont appelés respectivement résolvines E et résolvine D.

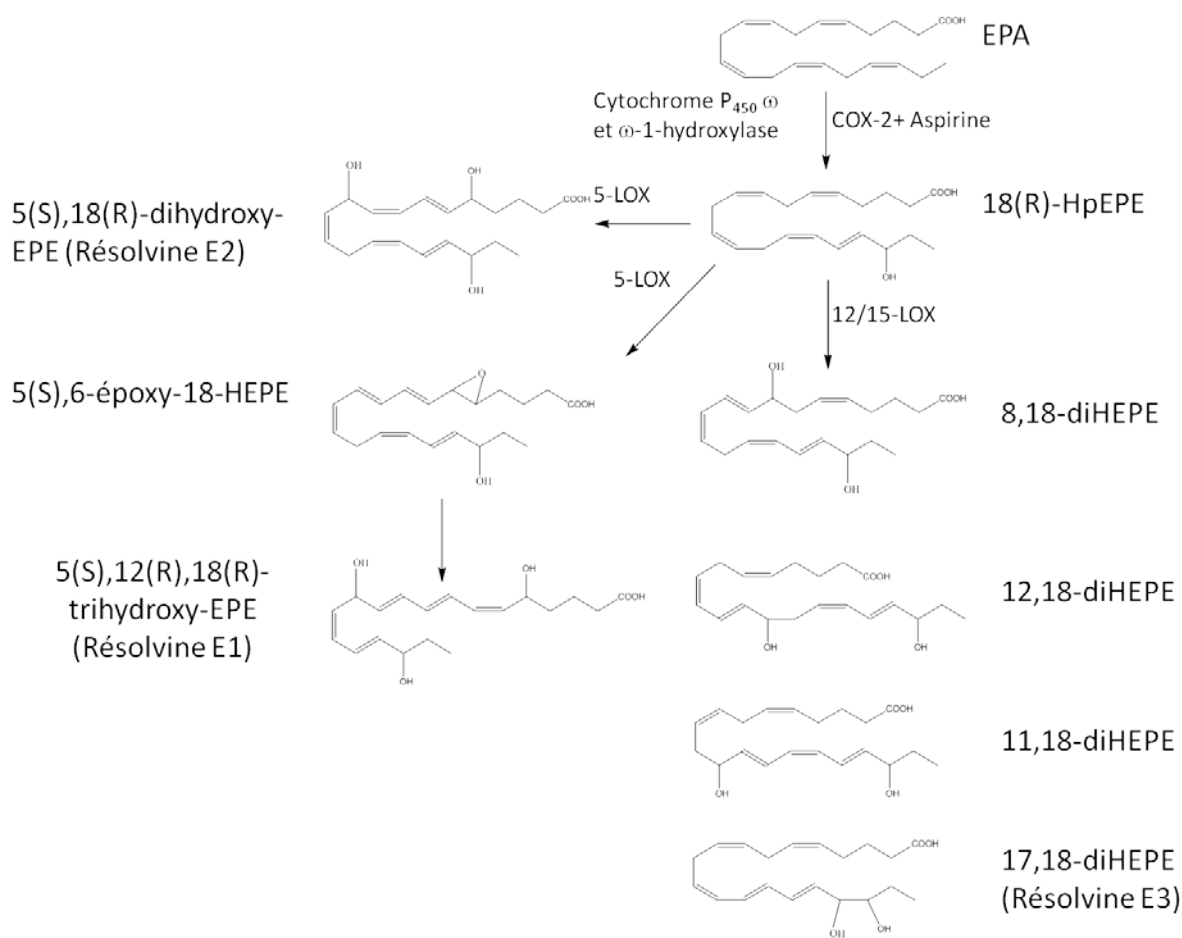
#### III.2.1 Les résolvines E (RvE)

Les résolvines E sont synthétisées *in vivo* dans des exsudats murins au cours de la phase de résolution et dans des systèmes de cellules isolées humaines comme par exemple, lors de l'interaction des cellules endothéliales avec des leucocytes ou dans le sang total. La stéréochimie des résolvines E (RvE1), a été établie comme étant l'acide 5(S),12(R),18(R)-trihydroxy-eicosapenta-6Z,8E,10E,14Z,16E-énoïque (Arita M *et al.*, 2005).

Dans les cellules endothéliales vasculaires, la COX-2 acétylée par l'ASA métabolise l'EPA en l'acide 18(R)-hydroperoxy-eicosapentaénoïque (18(R)-HpEPE) qui est rapidement capté par les leucocytes activés pour être converti en RvE1 et RvE2

**(Fig. 11).** Il a été aussi observé que le 18(R)-HpEPE était plus présent que le 18(S)-HpEPE dans le plasma humain provenant d'hommes en bonne santé ayant consommés de l'EPA (Oh SF *et al.*, 2011). Par contre, les patients traités par de l'ASA avait plus de 18(S)- que 18(R)-HpEPE, ce qui indique que l'aspirine favorise la production du 18(S)-HpEPE. Le 18(S)-HpEPE peut aussi être converti en épimère RvE1 et RvE2 via l'action concertée de la 5-LOX recombinante et de la LTA4 hydrolase (Oh SF *et al.*, 2011). La RvE1 est aussi formée via le cytochrome P<sub>450</sub> *in vivo* par une voie indépendante de l'aspirine (Serhan CN *et al.*, 2000). En outre, 18-HEPE est converti par la 12/15-LOX présent dans des éosinophiles ou des macrophages en 8,18-diHEPE, 11,18-diHEPE, 12,18-diHEPE, et 17,18-diHEPE (RvE3) qui est un nouveau composé anti-inflammatoire endogène (Isobe Y *et al.*, 2012) **(Fig. 11)**.

Au moins deux récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) : le ChemR23 et le récepteur du LTB<sub>4</sub>, BLT1 ("LTB<sub>4</sub> receptor 1") sont impliqués dans la médiation de l'action de RvE1 (Arita M *et al.*, 2005; Arita M *et al.*, 2007). Ces chercheurs ont montré que le ChemR23, spécifique de la RvE1, diminuait le facteur nucléaire NF-κB et que le complexe RvE1-BLT1 n'était pas formé avec des souris déficientes en BLT1. En plus, le RvE1 et le 18(S)-RvE1 peuvent partager le même site de liaison spécifique au ChemR23 et au BLT1.



**Figure 11: Schéma montrant la biosynthèse des résolvines E**

### III.2.2 Les résolvines D (RvD)

Les études sur les exsudats de souris ayant consommées du DHA et traitées par de l'aspirine dans la phase résolution fournissent la première preuve de nouvelles voies endogènes qui conduisent à la formation des résolvines D. La COX-2 acétylée par l'ASA convertit dans les cellules hypoxiques endothéliales humaines le DHA en 17(R)-hydroxy-DHA qui est capté par les neutrophiles humains. Ce dernier est transformé en deux séries de produits di-hydroxylés et trihydroxylés. Le mécanisme implique une oxygénation au niveau des carbones 4 et 7 (Serhan CN *et al.*, 2002).

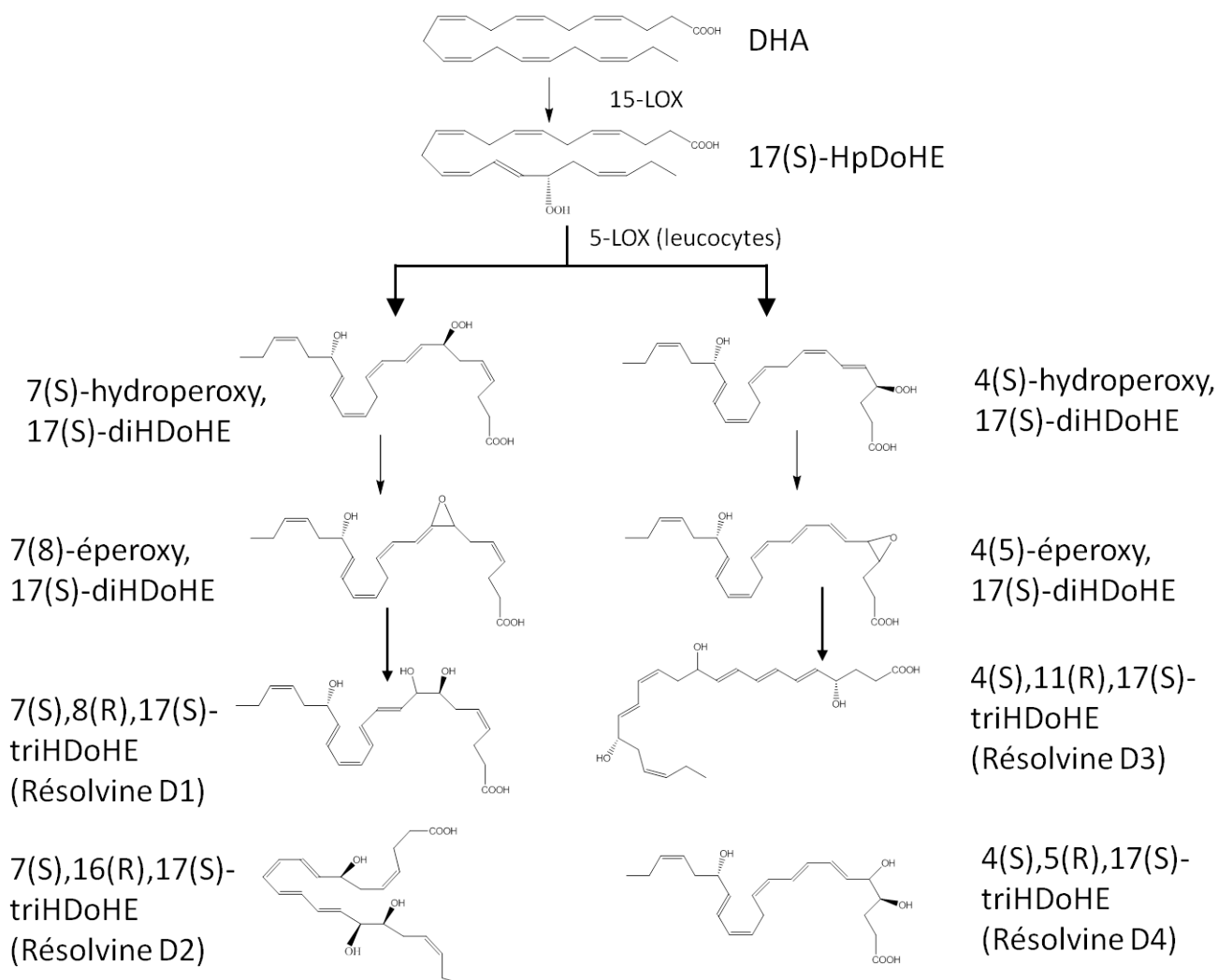
Les composés : 17(S)-, 17(R)-RvD1, et RvD2 ont été caractérisés par synthèse chimique comme étant respectivement les acides 7(S),8(R),17(S)-trihydroxy-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaénoïque, 7(S),8(R),17(R)-trihydroxy-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaénoïque pour la (17(R)-RvD1 ou AT-RvD1) (Sun YP *et al.*, 2007) et 7(S),16(R),17(S)-trihydroxy-docosa-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-hexaénoïque (Spite M *et al.*, 2009) (**Fig. 12**).

D'autres membres de cette famille ont été identifiés (de RvD3 à RvD6). Leurs voies de biosynthèses s'effectuent de façon similaire à celles décrites pour RvE1 sauf pour RvD5 (l'acide 7(S),17(S)-dihydroxy-docosa-4Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaénoïque) et pour RvD6 (l'acide 4(S),17(S)-dihydroxy-docosa-5E,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaénoïque) mais leurs structures sont différentes. Leurs propriétés biologiques n'ont pas encore été étudiées (Chiang N *et al.*, 2012).

Les RvE1 et RvD1 ont été identifiées dans le sang circulant de donneurs sains par Psychogios N *et al.*, 2011. Les RvD1 et AT-RvD1 générées par les PMN humains et murins (Serhan CN *et al.*, 2002) s'infiltrant dans le liquide péritonéal de souris de façon dose-dépendante. Elles bloquent la transcription de l'IL-1 $\beta$  induite par le "tumor necrosis factor  $\alpha$ " TNF- $\alpha$  dans les cellules microgliales (Hong S *et al.*, 2003).

Les RvDs réduisent les lésions du rein dans un modèle d'ischémie rénale chez la souris (Duffield JS *et al.*, 2006).

RvD1 active son propre récepteur couplé aux protéines G (RCPG) mais n'active pas le récepteur ChemR23 de RvE1 démontrant ainsi la grande sélectivité de ces ligands pour leur RCPG spécifique (Krishnamoorthy S *et al.*, 2010). La capacité de RvD1 à réduire les interactions cellulaires humaines (PMN-cellules endothéliales) dépend de la présence de récepteur spécifiques ALX/FPR2 et DRV1/GPR32 dans les cellules (Norling LV *et al.*, 2012). L'ALX/FPR2 est présent sur les leucocytes et sur les cellules résidentes (macrophages, fibroblastes synoviaux, cellules endothéliales et épithéliales). Le DRV1/GPR32 est abondant sur les PMN, les monocytes et les macrophages et est également présent sur les cellules endothéliales vasculaires (Krishnamoorthy S *et al.*, 2010). Les récepteurs ALX/FPR2 et GPR32 ont aussi été trouvés dans le tissu adipeux humain et murin (Clària J *et al.*, 2012).



**Figure 12: Schéma montrant la biosynthèse des résolvines D**

### III.3 Les protectines

Le DHA est aussi un précurseur d'une famille de molécules appelées Protectines (PD). Elles sont caractérisées par la présence d'un triène conjugué et de deux groupements hydroxylés. Le nom de «protectine » a été donné à cause de leurs actions de protection observées dans les tissus neuronaux et dans le système immunitaire, le préfixe neuro indique la localisation tissulaire.

### III.3.1 La protectine D1 (PD1)

Le DHA une fois libéré des phospholipides membranaires, est converti en 17(S)-OH-22:6n-3 et en acides gras di-hydroxylés par la 15-LOX. La protectine D1 (PD1) a été mise en évidence pour la première fois dans le cerveau et dans les cellules mononucléées activées (Serhan CN *et al.*, 2002; Hong S *et al.*, 2003). Sa structure a été caractérisée comme l'acide 10(R),17(S)-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaénoïque (Serhan CN *et al.*, 2006).

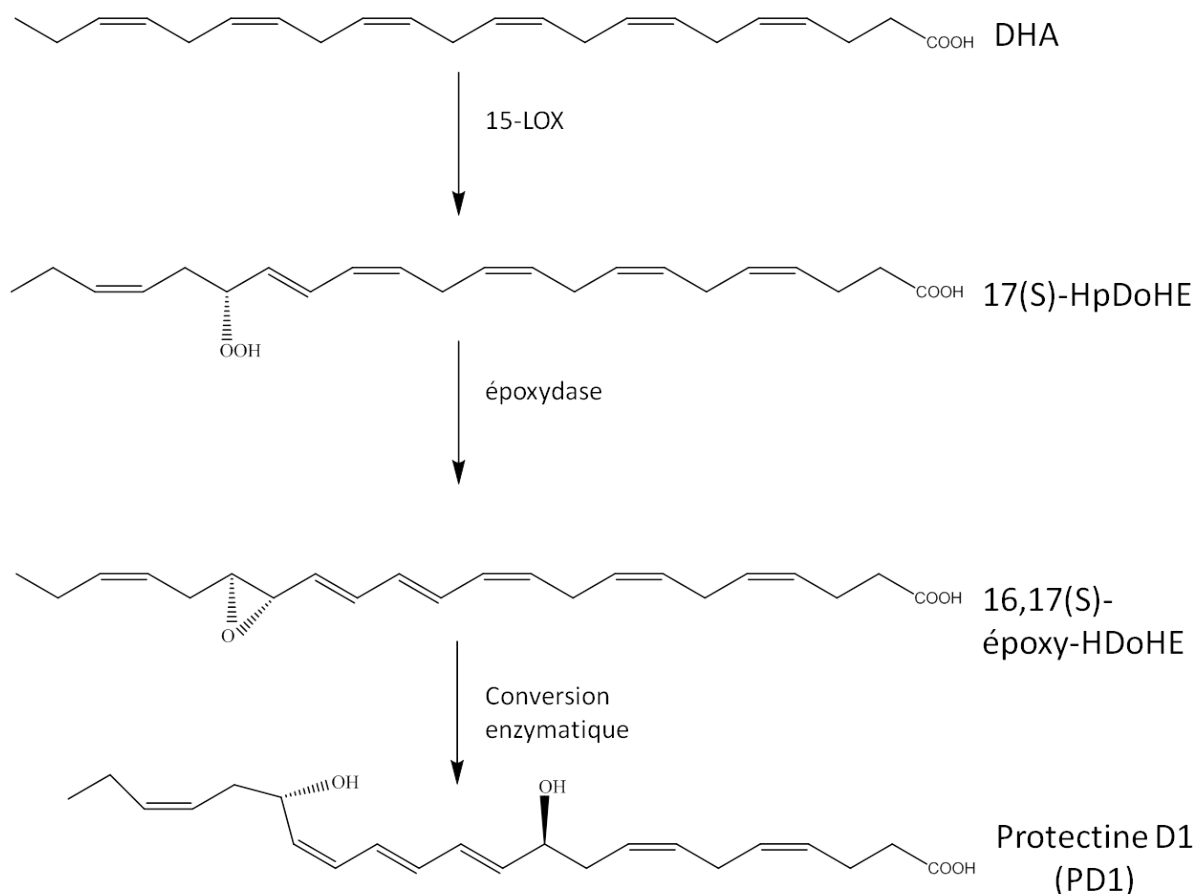
La PD1 métabolisée à partir du DHA endogène protège les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine contre le stress oxydant (Hong S *et al.*, 2003; Mukherjee PK *et al.*, 2004; Qin Q *et al.*, 2008; Bazan NG, 2005). La PD1 est aussi un signal de contre-régulation dans l'inflammation allergique des voies respiratoires en modulant l'inflammation dans les poumons de patients asthmatiques (Levy BD *et al.*, 2007). Elle inhibe l'infiltration des leucocytes, le NF- $\kappa$ B, et l'induction de la COX-2. Elle contrecarre aussi une blessure médiée par des leucocytes ainsi que l'induction de gènes pro-inflammatoires.

La PD1 est impliquée dans la protection de l'ischémie-reperfusion (Marcheselli VL *et al.*, 2003). Elle favorise la survie des cellules du cerveau par l'induction de programmes d'expression génique de l'anti-apoptose et neuroprotecteur en supprimant la neurotoxicité induite par les  $\beta$ -peptides amyloïdes: Abeta42 dans la maladie d'Alzheimer (Lukiw WJ *et al.*, 2005; Bazan NG, 2009). La PD1 joue un rôle protecteur des lésions nécro-inflammatoires hépatiques en réduisant sensiblement l'expression de la COX-2 (González-Pérez A *et al.*, 2006).

la PD1 est un puissant anti-inflammatoire plus efficace que ses isomères : 10(S),17(S)-diHDoHE, 4(S),17(S)-diHDoHE, 7(S),17(S)-diHDoHE, et que le 22-hydrox-10,17(S)-docosatriène (un produit d'inactivation putatif de la PD1), ce qui laisse penser que la stéréochimie du carbone 10 pourrait jouer un rôle important dans son activité ( Serhan CN *et al.*, 2002; Hong S *et al.*, 2003).

Le mécanisme de la synthèse de la PD1 est présenté dans la Figure 13 (**Fig. 13**).

Le DHA est catalysé par une enzyme LOX-like en acide 17(S)-hydroperoxy-docosahexaénoïque (17(S)-H(p)DoHE) qui est ensuite converti en un intermédiaire: 16,17-époxyde. Cet époxyde est alors transformé en PD1 par des étapes enzymatiques spécifiques. La formation du 16,17(S)-époxyde a été confirmée par le piégeage d'un intermédiaire avec deux diols vicinaux (Hong S *et al.*, 2003; Serhan CN *et al.*, 2006). La formation de cet époxyde ne ferait pas intervenir une cytochrome P<sub>450</sub> époxydase (Graham-Lorence S *et al.*, 1997) comme cela a été rapporté pour la synthèse des résolvines (Hong S *et al.*, 2003). Le mécanisme de la synthèse de la PD1 est similaire à celui qui a été montré pour la synthèse des leucotriènes via la LTA<sub>4</sub> hydrolase (Rudberg PC *et al.*, 2002; Haeggström JZ, 2004). L'époxyde intermédiaire s'hydrolyse en milieu aqueux et forme un cation carbonium intermédiaire. Cette étape est suivie d'un réarrangement de la molécule et d'une hydroxylation.



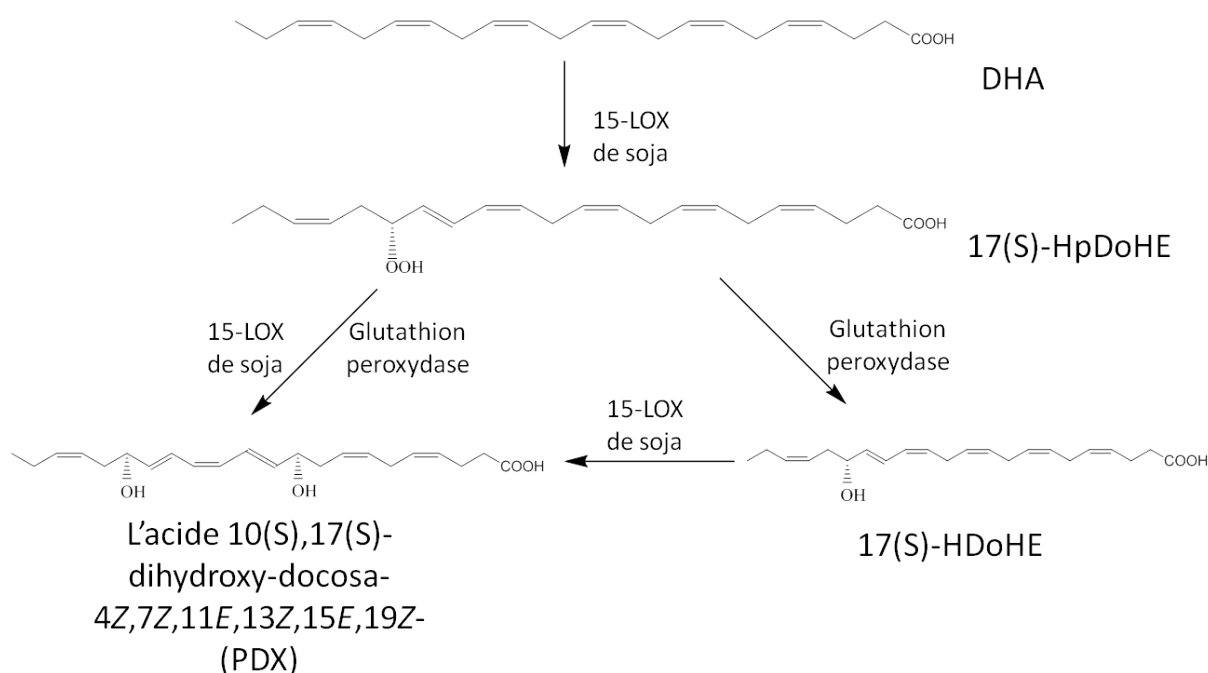
**Figure 13: Schéma montrant la biosynthèse de la protectine D1**



Récemment, la biosynthèse d'un épimère (17(R)) de la PD1 (AT-PD1) produit par la COX-2 en présence d'aspirine a été rapporté (Marcheselli VL *et al.*, 2003). Sa structure a été caractérisée comme l'acide 10(R),17(R)-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaénoïque. La PD1 et l'AT-PD1 réduisent l'infiltration des leucocytes dans la péritonite murine, la transmigration des PMN avec des cellules endothéliales, et renforcent l'efferocytose par des PMN apoptotiques et par des macrophages (Serhan CN *et al.*, 2006).

### III.3.2 La protectine DX (PDX)

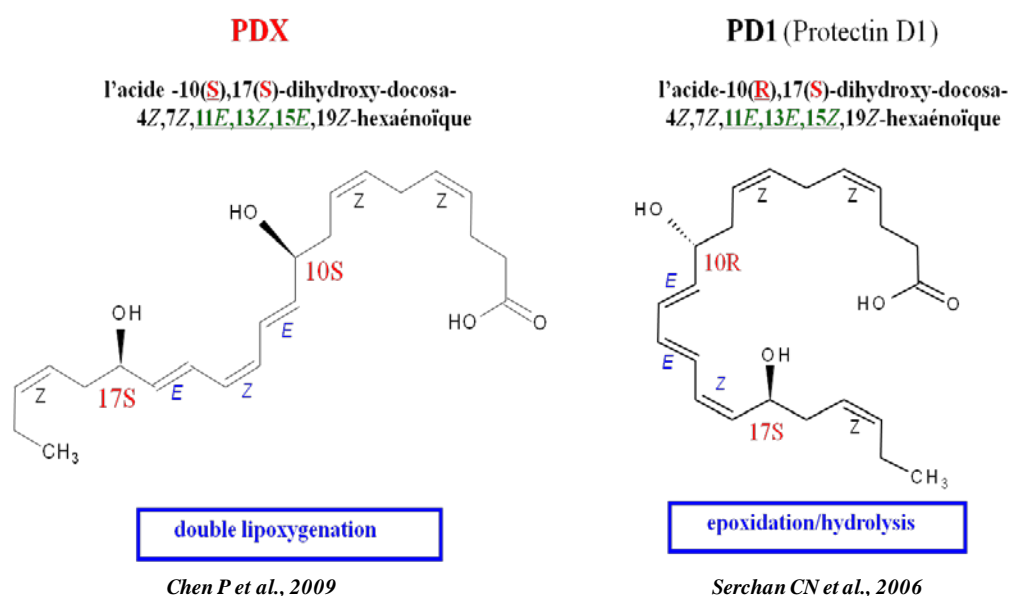
Récemment, Chen P a caractérisé un isomère de la protectine D1 (PD1) ou acide 10(S),17(S)-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaénoïque (PDX) qui est synthétisé à partir du DHA *via* la sLOX (Chen P *et al.*, 2009) (**Fig. 14**). La PDX peut aussi être synthétisée à partir du 17(S)-HDoHE avec la sLOX.



**Figure 14: Schéma montrant la biosynthèse de la PDX**

Cette molécule diffère de la PD1 au niveau de la stéréochimie du carbone 10 qui est S pour la PDX et R pour la PD1. La géométrie des doubles liaisons du triène conjugué est *E/Z/E* dans la PDX est *E/E/Z* dans la PD1 (**Fig. 15**). La synthèse de la PDX implique une double oxygénation alors que celle de la PD1 fait intervenir un mécanisme avec un époxyde intermédiaire.

Les travaux de Chen P complète la caractérisation de la PDX décrite par Butovich (Butovich IA, 2005; Butovich IA, 2006) et montre clairement que la PDX est formée par un mécanisme de dioxygénation.



**Figure 15: Structure de la PDX et de la PD1**

Nous avons récemment montré que la PDX inhibe l'agrégation plaquettaire à des concentrations submicromolaires. Elle inhibe la COX-1 mais pas la 12-LOX plaquettaire. La PDX diminue la production des prostaglandines PGE<sub>2</sub> et D<sub>2</sub> synthétisées respectivement par la COX-1 commerciale et par la COX-2 recombinante humaine. Elle inhibe la dégranulation des neutrophiles et la libération

de la myéloperoxydase (MPO). Elle inhibe l'activité de la NADPH oxydase et diminue les espèces réactives dérivées de l'oxygène (“reactive oxygen species” ROS) (Liu M *et al.*, 2013, Lipids, soumis à publication).

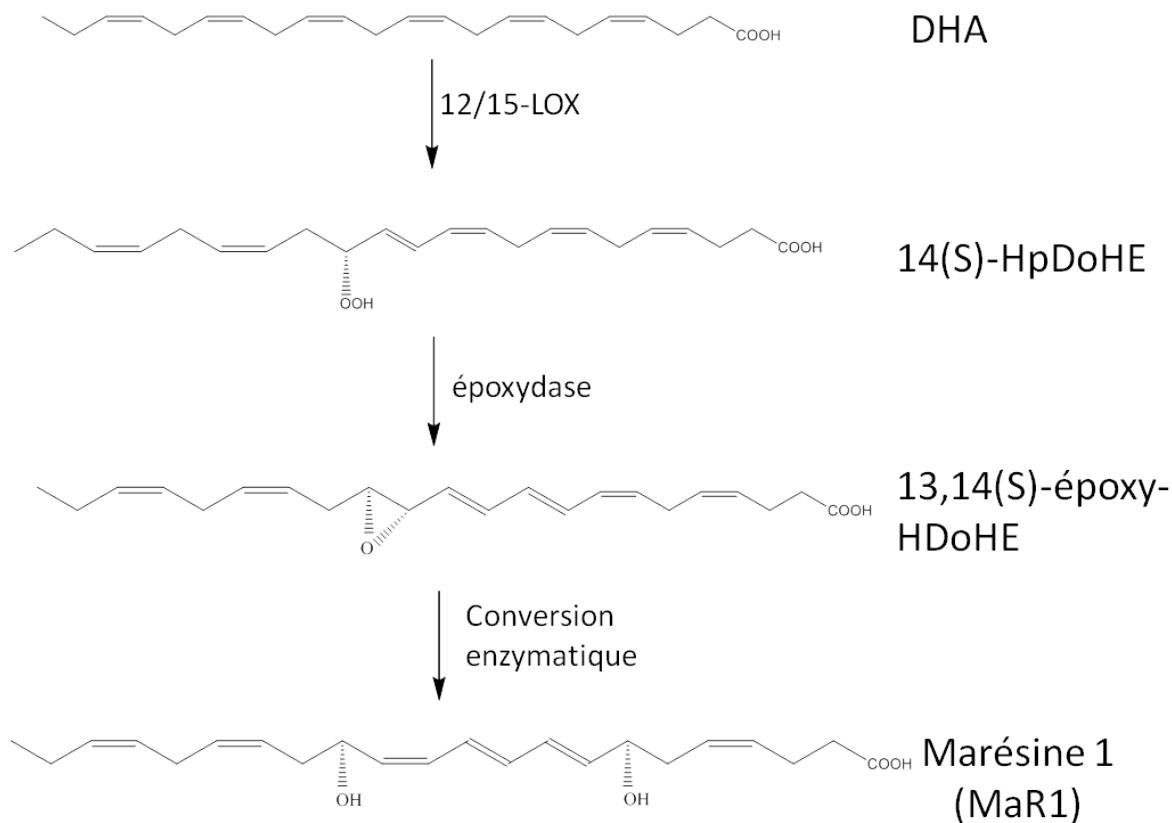
La géométrie *E/Z/E* des doubles liaisons du triène conjugué est indispensable pour inhiber l'agrégation plaquettaire. Les acides gras di-hydroxylés qui contiennent un motif triène *Z/E/E* ou *E/E/E* sont inactifs. Pour cette raison, la PDX et les autres produits oxygénés formés à partir d'acides gras polyinsaturés d'intérêt nutritionnel, avec un triène conjugué *E/Z/E* ont été collectivement nommées poxytrines (PUFAs oxygenated triènes) (Chen P *et al.*, 2011).

### III.4 Les marésines

Récemment, une nouvelle famille de “specialized pro-resolving mediators” (SPM) synthétisée par des macrophages a été découverte par Serhan *et al.* (Serhan CN *et al.*, 2009). Ces molécules appelées "marésines" présentent des propriétés anti-inflammatoires “proresolving”. La plus abondante est la marésine 1 (MaR 1) ou acide 7(R),14(S)-dihydroxy-docosa-4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaénoïque qui a été montrée inhiber l'infiltration des PMN et stimuler la phagocytose des macrophages.

Le schéma de la synthèse des marésines est présenté dans la **Figure 16**. Le DHA est converti en acide 14(S)-hydroperoxy-docosahexaénoïque (14(S)-H(p)DoHE). Le 14(S)-H(p)DoHE est alors converti enzymatiquement en 13,14-époxyde intermédiaire. Ceci a été démontré par l'utilisation d'oxygène 18 (<sup>18</sup>O). Le mécanisme proposé est identique à celui proposé pour la synthèse de la PD1 (Serhan CN, 2009).

Un nouvel isomère de MaR 1 le 7(S),14(S)-diHDHA est formé par un mécanisme de double dioxygénation identique à celui décrit pour la synthèse de la PDX (Serhan CN *et al.*, 2009).



**Figure 16: Schéma montrant la biosynthèse de la marésine 1**

#### IV. Les métabolismes oxygénés de l'ALA

L'ALA constitue environ 57% des acides gras totaux du lin (Morris DH, 2007). Cet acide gras essentiel appartient à la famille des AGPIs de la série n-3. Chez l'Homme, l'ALA représente < 1% des acides gras totaux dans les phospholipides du plasma (Fretts AM *et al.*, 2013).

Chez les mammifères, la transformation de l'ALA ingéré en EPA et DHA est relativement faible avec des taux de conversion d'environ 5% pour l'EPA et < 0,5% pour le DHA (Plourde M & Cunnane SC, 2007).

Les différentes voies métaboliques de l'ALA sont détaillées ci-dessous :

## IV.1 $\beta$ -oxydation

Le métabolisme de l'ALA est principalement dirigé vers la  $\beta$ -oxydation pour produire de l'énergie. Il concerne environ 60-85% de l'ALA (Cunnane SC & Anderson MJ, 1997; Poumes-Ballihaut C *et al.*, 2001) et atteint environ 67% dans le cerveau (Demar JC Jr *et al.*, 2005) alors que seulement 30% de AA est  $\beta$ -oxydé dans ce compartiment (Golovko MY & Murphy EJ, 2006 ; Golovko MY *et al.*, 2007 ; Murphy EJ *et al.*, 2005). La  $\beta$ -oxydation n'est pas limitée à l'ALA. Ainsi environ 50% des AGPIs de la série n-6 sont  $\beta$ -oxydés ainsi qu'environ 65% du DHA (Poumes-Ballihaut C *et al.*, 2001). La  $\beta$ -oxydation de l'ALA est plus faible chez les femmes que chez les hommes (Burdge G, 2004).

Il est aussi recyclé dans les tissus pour la production d'autres acides gras, d'acides aminés, et de stérols, notamment dans le cerveau et le foie. Ainsi, la biosynthèse *de novo* du cholestérol à partir de l'ALA a été rapportée chez des singes (Sheaff Greiner RC *et al.*, 1996; Cunnane SC *et al.*, 2003). Ce métabolisme est rapide. Dans le foie et le cerveau, le recyclage des carbones des AG prend de 5 à 10 min (Demar JC Jr *et al.*, 2005).

## IV.2 Voies de la désaturation et d'élongation de l'ALA

L'ALA est transformé en acides gras à longue chaîne par une succession de désaturations et d'élongations alternées. Toutes les réactions ont lieu au niveau du réticulum endoplasmique à l'exception de la réaction finale pour former le DHA qui a lieu dans les peroxysomes. La première étape dans le métabolisme de l'ALA est sa désaturation, catalysée par la delta-6-désaturase, suivie par l'addition de 2 groupements méthylène (ou 2  $-\text{CH}_2-$ ). Elle est suivie d'une étape de désaturation pour former l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (voir § I.1 Fig. 2). Cette dernière est

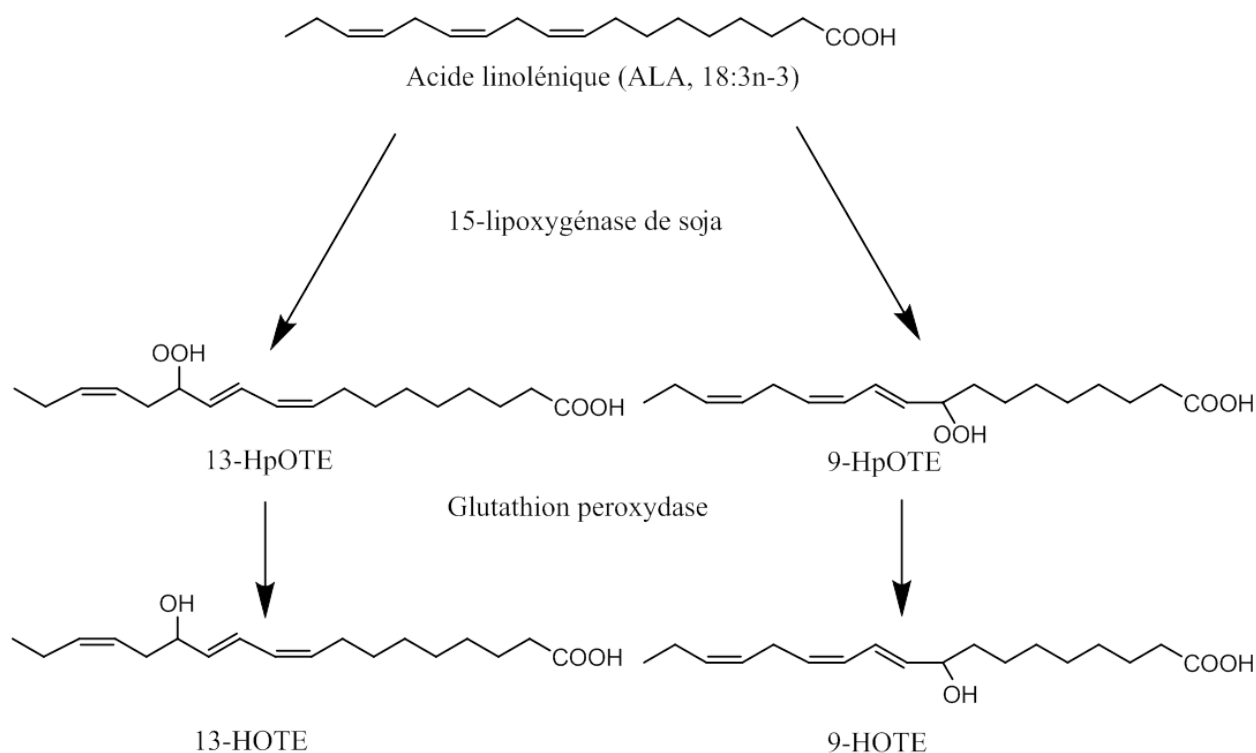
cinétiquement limitante et est particulièrement affectée par des facteurs nutritionnels et hormonaux (Cunnane SC *et al.*, 2003). Les étapes de désaturation sont lentes, tandis que les étapes d'élongation sont rapides. Pour cette raison, la concentration d'acide stéaridonique (18:4n-3) mesurée dans les tissus est généralement faible: il est formé lentement par désaturation et est rapidement allongé (Horrobin DF & Manku MS, 1990). L'EPA est ensuite converti en acide docosapentaénoïque (DPA) par élongation. La synthèse de DHA exige une élongation supplémentaire pour former l'acide tétracosapentaénoïque (24:5n-3) qui est suivie d'une désaturation (enzyme  $\Delta 6$ -désaturase) pour former 24:6n-3. La synthèse de DHA implique la translocation de 24:6n-3 à partir du réticulum endoplasmique vers les peroxysomes où il est converti en acide docosahexaénoïque (DHA) par  $\beta$ -oxydation. La complexité de la conversion du DPA en DHA peut représenter une étape de contrôle métabolique (Sprecher H, 2000). Cet auteur suggère que la synthèse du DHA puisse être régulée indépendamment de celle de l'EPA et du DPA. Récemment, il a aussi été montré que les  $\Delta 5$ - et  $\Delta 6$ -désaturases hépatiques sont activées avec un régime riche en ALA. Ce dernier conduit à l'augmentation des AGPI à longue chaîne de la série n-3 et notamment du DHA dans le cerveau et le cœur (Blanchard H *et al.*, 2013).

Divers facteurs influent sur le taux de transformation de l'ALA: le sexe (les jeunes femmes transforment plus d'ALA en AG n-3 à longue chaîne (Pawlosky R *et al.*, 2003; Burdge GC, 2003), le tabagisme (réduction de la transformation de l'ALA en EPA et DHA) (Marangoni F *et al.*, 2004). Chez l'Homme, un régime riche en acide linoléique réduit aussi jusqu'à 40 % la transformation de l'ALA (Emken EA, 1994).

### IV.3 Métabolisme oxygéné de l'ALA par les LOXs

L'ALA est oxydé par l'enzyme sLOX majoritairement en acide 13-hydroperoxy-octadécatriénoïque (13-HpOTE) et un peu en acide 9-hydroperoxy-octadécatriénoïque (9-HpOTE) en insérant une molécule d'oxygène respectivement en position n-6 et n-9 de la chaîne carbonée de l'ALA (**Fig. 17**). Ces hydroperoxydes sont ensuite réduits par

une glutathion peroxydase en leurs acides gras mono-hydroxylés correspondants: 13-HOTE et 9-HOTE.



**Figure 17: Schéma montrant le métabolisme de l'ALA par sLOX**

La sLOX est une dioxygénase qui oxyde l'AA en 15-HpETE. Ce dernier est ensuite converti en 8,15-diHpETE et en 5,15-diHpETE (Bild GS *et al.*, 1977; Van Os CP *et al.*, 1981). En outre, la sLOX a été rapportée convertir le 5,15-di-HpETE en lipoxine pour former deux isomères A et B (Sok DE *et al.*, 1988).

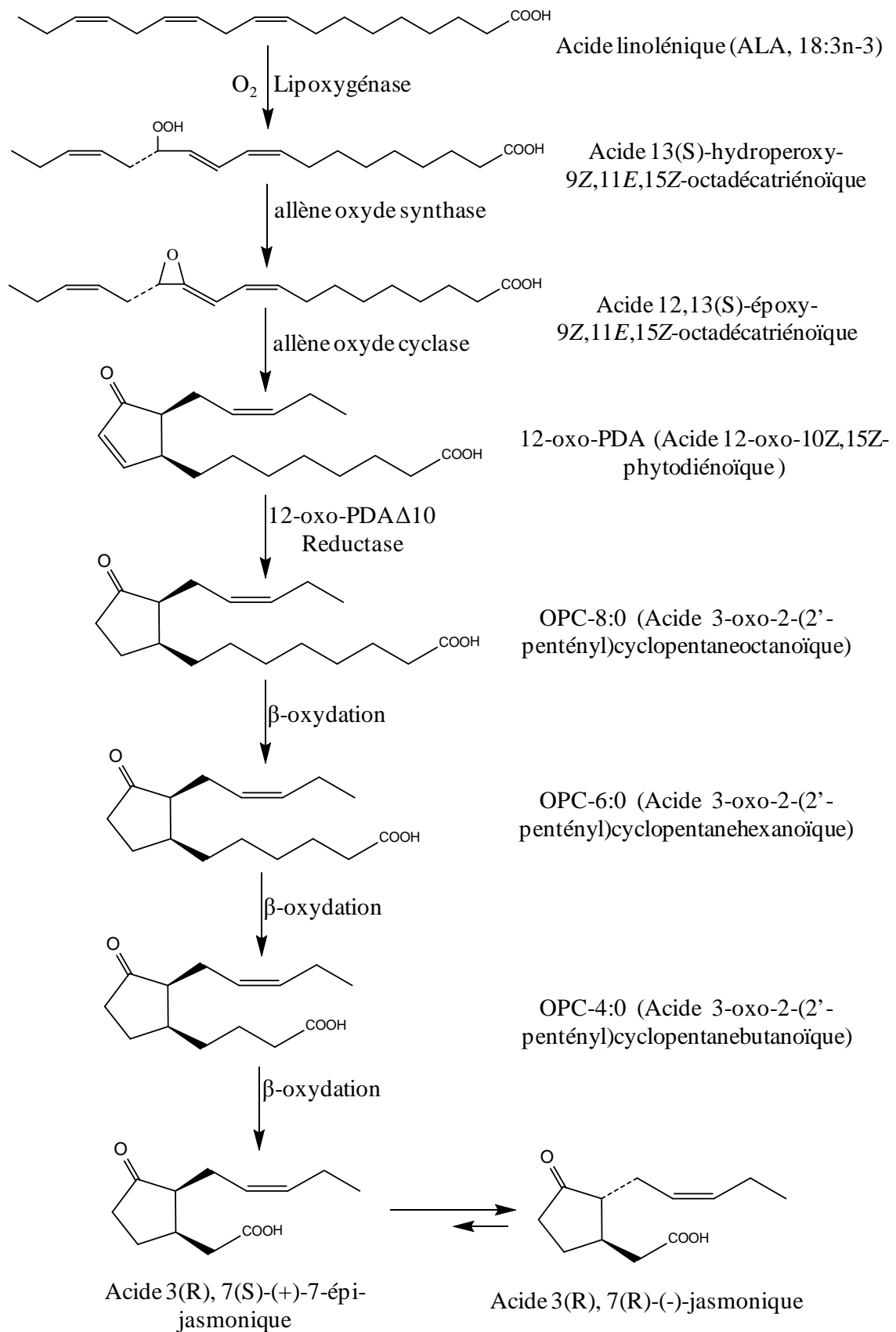
Sok et Kim ont aussi montré que la sLOX pouvait former quatre isomères 9,16-diHOTE à partir de l'ALA (Sok DE & Kim MR, 1990). Ces isomères 9,16-di-HOTE peuvent aussi être formés à partir de l'acide 9(S)-hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE) par la lipoxygénase de pomme de terre. Cette dernière utilise préférentiellement le 9-HODE comme substrat (Grechkin *et al.*, 1991). Cependant la caractérisation des isomères 9,16-di-HOTE n'a été que partiellement décrite et les effets biologiques de ces isomères n'ont pas été étudiés.

## Voie conduisant à la formation de l'acide jasmonique

L'acide jasmonique est synthétisé à partir de l'ALA par la voie lipoxygénase en passant par un dérivé hydroperoxyde. L'hydroperoxyde de ALA pourrait être converti en un acide gras cyclique avec 18 carbones, l'acide 12-oxo-10Z,15Z-phytodiénoïque (12-oxo-PDA), par l'allène oxyde cyclase. Trois étapes de  $\beta$ -oxydation successives qui enlèvent six carbones de la chaîne latérale du 12-oxo-PDA (**Fig. 18**) (Vick BA & Zimmerman DC, 1984; Mueller MJ, 1997) conduisent à l'acide jasmonique.

La signalisation de l'acide jasmonique est nécessaire pour la résistance des plantes aux organismes nuisibles, tels que les agents pathogènes nécrotrophes et les insectes herbivores. Lorsque les plantes sont attaquées, elles répondent en libérant l'acide jasmonique, qui active l'expression d'inhibiteurs de protéases. Ces derniers bloquent l'activité protéolytique des protéases digestives des insectes (Kreft S *et al.*, 1997; Van Wees SC *et al.*, 2013).





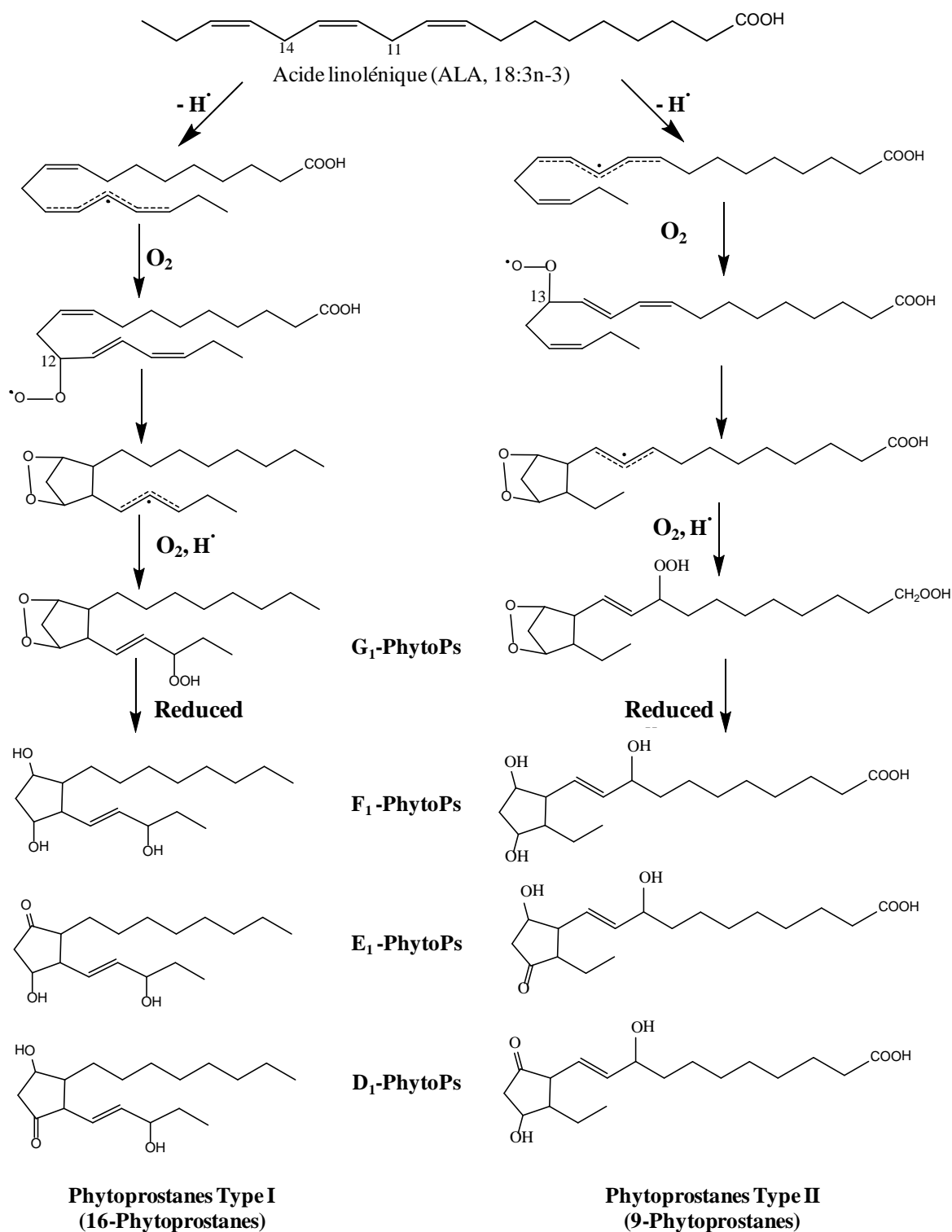
**Figure 18: Biosynthèse de l'acide jasmonique**

#### IV.4 Métabolisme de l'ALA en phytoprostanes

L'ALA est un acide gras majeur dans les membranes cellulaires des plantes. Sa peroxydation initiée par les radicaux libres non enzymatique conduit à une série d'isoprostanes à 18 carbones (C18-IsoPs) ou phytoprostanes (PhytoP) (Parchmann S & Mueller MJ, 1998; Durand T *et al.*, 2009). Contrairement aux prostaglandines animales produites via la voie de la cyclooxygénase (COX-1 et COX-2), les PhytoPs résultent d'un processus radicalaire non enzymatique similaire à celui qui engendre les IsoPs. (Imbusch R & Mueller MJ, 2000; Durand T *et al.*, 2009).

Le mécanisme de formation des PhytoPs comporte l'abstraction initiale d'un atome d'hydrogène et l'insertion d'une molécule d'oxygène (**Fig. 19**). Il existe deux familles de PhytoPs. Elles résultent de l'abstraction de l'hydrogène lié au carbone 14 et donne des PhytoPs de type I (16-PhytoPs) ou de l'hydrogène lié au carbone 11 pour former les PhytoPs de type II (9-PhytoPs) (Durand T *et al.*, 2009).

Les PhytoPs possèdent des activités biologiques dans diverses espèces végétales. Elles peuvent induire des réponses adaptatives en agissant sur l'expression des gènes et sur le plan physiologique (Durand T *et al.*, 2009; Durand T *et al.*, 2011). Cette réponse adaptative pourrait fournir à la plante un avantage de survie, par détoxification des produits de peroxydation lipidique obtenus dans des conditions de stress oxydatif. Les PhytoPs présentent également plusieurs activités biologiques dans des modèles animaux. E<sub>1</sub>-PhytoP inhibe *in vitro* la production de l'IL-12 des cellules dendritiques et augmente la polarisation des cellules T helper (Th) 2 (Mariani V *et al.*, 2007). *In vivo*, E<sub>1</sub>-PhytoP et F<sub>1</sub>-PhytoP inhibent partiellement la production des cytokines Th1 et Th2 (Gutermuth J *et al.*, 2007).



**Figure 19: Mécanisme de formation des phytosteranes**

*L'oxydation de l'ALA catalysée par des radicaux libres donne deux régioisomères endoperoxydes bicycliques (PPG<sub>1</sub> types I et II), qui sont convertis en différents régioisomères: F<sub>1</sub>-PhytoPs, E<sub>1</sub>-PhytoPs et D<sub>1</sub>-PhytoPs.*

## **Chapitre 2 : Rappels sur les plaquettes sanguines et les leucocytes polynucléaires neutrophiles (PMNs)**

### **I. Les plaquettes sanguines**

#### **I.1 Origine et structure**

Les plaquettes sont des cellules hématopoïétiques anucléées de forme discoïde avec un diamètre 2 à 4  $\mu\text{m}$ . Elles jouent un rôle majeur dans les mécanismes de l'hémostase, de la coagulation et de la thrombose. Elles se forment par fragmentation cytoplasmique des mégacaryocytes dans la moelle osseuse. La numération normale plaquettaire chez une personne saine est entre 150 000 et 400 000 plaquettes /  $\mu\text{l}$  de sang. Leur durée de vie est d'environ 8 à 10 jours. Environ 2/3 des plaquettes circulent dans le sang (130 000 à 400 000 plaquettes /  $\mu\text{l}$ ), le reste est séquestré de façon réversible dans la rate. Les plaquettes âgées sont phagocytées par les macrophages de la moelle osseuse et également par le foie et la rate (Blache D, 1992; Kuwahara M *et al.*, 2002; Willoughby S *et al.*, 2002).

##### **I.1.1 La membrane**

La membrane plaquettaire est constituée de 2 feuillets de phospholipides. Il existe un système canaliculaire connecté à la surface correspondant à des invaginations profondes de la membrane externe. Il permet l'expulsion des granules lors de l'activation plaquettaire.

La membrane comprend majoritairement des phospholipides (65-70%). Les phosphatidylcholines (PC) et les sphingomyélines (SM) sont majoritairement confinées sur le feuillet externe, tandis que les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS) et les phosphatidylinositols (PI) sont principalement sur le feuillet interne où ils peuvent servir des substrats à différentes phospholipases. Les PE et PC constituent des réservoirs important d'AA. La membrane plasmique contient également des lipides neutres (20-25%) (cholestérol et acides gras non estérifiés) et des glycoprotéines (2-5%).

Le système tubulaire dense est un système de membranes non connecté à la surface qui est l'équivalent du réticulum endoplasmique lisse résiduel du mégacaryocyte. Il contient les réserves de calcium et de magnésium pour la régulation du transport du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ainsi que les enzymes du métabolisme lipidique impliquées dans la synthèse de prostaglandines.

### **I.1.2 Cytosquelette**

Le cytosquelette est composé d'un faisceau de 8 à 24 microtubules (tubuline) en périphérie interne de la plaquette (Italiano JE Jr & Shivdasani RA, 2003). Il stabilise la bicouche lipidique et maintient la structure discoïde de la plaquette au repos (désassemblage lors de l'activation). Il comporte aussi un réseau de microfilaments d'actine partant dans le cytoplasme, et de petits filaments d'actine reliés à la membrane externe qui interviennent dans la contraction, la dégranulation, la rétraction du caillot et l'émission des pseudopodes. Il est composé de filaments intermédiaires de vimentine qui jouent un rôle important dans le soutien et l'ancrage des organites dans le cytoplasme.

### **I.1.3 Cytoplasme**

Le cytoplasme des plaquettes contient un grand nombre d'organites : des mitochondries, des grains de glycogène, des lysosomes, des peroxysomes et plusieurs types des granules dont des granules  $\alpha$  et des granules dense qui sont des granules de stockage spécifiques des plaquettes. Ils sécrètent leur contenu lors de l'activation. Les granules  $\alpha$  contiennent des protéines comme le fibrinogène (acquis par endocytose), le facteur plaquettaire 4 (PF-4) (synthétisés par les mégacaryocytes), la  $\beta$ -thromboglobuline ( $\beta$ -TG), le facteur de croissance "Platelet Derived Growth Factor" (PDGF), la fibronectine, la thrombospondine, PAI-1 et le facteur von Willebrand (vWF). Ils contiennent des antiprotéases, des facteurs de coagulation et un facteur mitogène (capable d'activer la prolifération). Les granules denses sont riches en

adénosine diphosphate (ADP) qui renforce l'agrégation et les réactions de coagulation, adénosine triphosphate (ATP), sérotonine, pyrophosphate, calcium et magnésium.

## **I.2 Physiologie**

Les plaquettes jouent essentiellement un rôle dans la coagulation, en intervenant dans le plasma, à la suite de la rupture d'un vaisseau sanguin ou d'une lésion au niveau de leur endothélium. Les plaquettes circulent dans le sang sans adhérer à l'endothélium vasculaire lorsqu'elles ne sont pas activées. Lorsqu'il existe une brèche vasculaire, les plaquettes adhèrent au sous-endothélium.

### **I.2.1 Adhésion**

La rupture de l'intégrité de l'endothélium vasculaire mobilise différents composants vasculaires: différents types de collagènes, du facteur von Willebrand (vWF), de la fibronectine, du fibrinogène, de la laminine, de la fibuline et de la thrombospondine.

Le facteur vWF est essentiel à l'étape d'adhésion initiale. Il joue le rôle d'une «colle» entre le sous-endothélium et les glycoprotéines de la membrane plasmique. Sa liaison au collagène entraîne un changement conformationnel qui lui permet d'interagir avec le récepteur plaquettaire GP Ib-IX. Le complexe GP Ib-IX est exprimé de façon constitutive à la surface des plaquettes au repos, il se lie au facteur vWF qu'après son interaction avec la matrice sous-endothéliale. Cette liaison aboutit à une activation des filaments d'actine et la contraction des plaquettes avec la formation de pseudopodes, la mobilisation du calcium membranaire et la libération des granules.

### **I.2.2 Activation**

Après adhésion, le processus d'hémostase exige le recrutement d'autres plaquettes pour former un clou hémostatique. L'hémostase est un processus qui permet l'interruption d'un saignement lors d'une lésion vasculaire (Ferguson JJ, 2006). Les

plaquettes, activées par le collagène sous-endothélial et la thrombine générée à leur surface, libèrent et produisent de nombreux médiateurs autocrines et paracrines : L'ADP, stocké dans les granules denses est libéré. Il active d'autres plaquettes au niveau de la lésion vasculaire (Tobelem G, 1989). De plus, nombreux agents, tel que le thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), la sérotonine, l'épinéphrine et le "platelet activating factor" (PAF) sont aussi libérés par les plaquettes activées. Ils provoquent l'agrégation des plaquettes nouvellement recrutées. L'activation plaquettaire entraîne un changement conformationnel du complexe GP IIb-IIIa, qui est le récepteur du fibrinogène, responsable de l'agrégation plaquettaire (Shattil SJ, 1999). Le fibrinogène circulant forme des ponts interplaquettaires de fibrine reliant ainsi les plaquettes agrégées pour former le caillot. La thrombine est aussi un puissant activateur plaquettaire. Elle est générée à la surface des plaquettes activées à partir de la prothrombine circulante et clive le fibrinogène en fibrine (Heemskerk JW *et al.*, 2002).

Le changement de forme des plaquettes, d'une forme discoïde à sphérique, est la réponse initiale des plaquettes aux agonistes tels que la thrombine, l'ADP ou le TxA<sub>2</sub>. Ce changement de forme induit par des concentrations d'agonistes inférieures à celles requises pour la dégranulation et l'agrégation, est considéré comme un pré requis pour une sécrétion efficace du contenu des granules.

Les phospholipases catalysent le clivage des phospholipides (PL) membranaires et génèrent à partir de l'AA des messagers qui participent à la transduction de signaux intracellulaires. L'AA est clivé des PL par deux voies majeures :

1) la voie de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>): (Aplitz-Castro RJ *et al.*, 1979) la PLA<sub>2</sub> hydrolyse spécifiquement la liaison ester en position *sn*-2 des PL pour libérer un acide gras libre et un lysophospholipide. Des concentrations submicromolaire de Ca<sup>2+</sup> sont nécessaires pour leur activité.

2) la voie de la phospholipase C (PLC) (Banno Y *et al.*, 1995) fait intervenir les acyl-glycérol lipases et elle est activée par des protéines G ou par des tyrosines kinases.

Les molécules proagrégantes (endoperoxydes cycliques de prostaglandines et thromboxane A<sub>2</sub>) sont synthétisées à partir de l'AA par la COX-1 au cours de l'activation (voir § II.1 dans Chapitre 1).

L'activation plaquettaire et l'activation de la cascade de coagulation sont des

processus complémentaires très imbriqués. La sécrétion plaquettaire fournit des facteurs de coagulation additionnels telle que le fibrinogène. Les plaquettes contribuent à la formation de la thrombine par le complexe prothrombinase lors d'une activation forte. L'exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique des plaquettes est essentielle à leur activité procoagulante (Heemskerk JW *et al.*, 2002).

### **I.2.3 Agrégation**

L'agrégation est l'étape qui conduit à l'accumulation de plaquettes formant le thrombus blanc. Cette accumulation est basée sur de multiples interactions plaquettes/plaquettes et est médiée par des substrats d'adhésion liées aux membranes des plaquettes.

Il existe plusieurs mécanismes distincts pouvant initier l'agrégation plaquettaire en fonction des conditions de vitesses de cisaillement: Par exemple, à des vitesses inférieures à  $1000\text{ s}^{-1}$ , le fibrinogène engagé à la surface des plaquettes adhérentes interagit avec le récepteur GPIIb/IIIa des plaquettes circulantes pour former des ponts interplaquettaires. Les agonistes solubles produits permettent un changement de forme et une augmentation de l'activation de GPIIb/IIIa qui stabilise ainsi le thrombus. L'agrégation plaquettaire est régulée dans sa phase finale par l'activation du récepteur GPIIb/IIIa quel que soit l'élément déclencheur (ADP, thrombine, collagène ou vWF).

## **I.3 Métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes**

L'AA est un AGPI majeur des membranes plaquettaires. Il représente 20% de la totalité des acides gras (Marcus AJ, 1969) et joue un rôle important dans l'hémostase en tant que précurseur des eicosanoïdes de la série 2. Après sa désacylation des phospholipides, il est rapidement métabolisé en divers composés biologiquement décrits dans le chapitre 1 § II.1 et II.2.2.



## II. Les leucocytes polynucléaires neutrophiles (PMNs)

### II.1 Les différentes classes de leucocytes

Les leucocytes ou globules blancs sont des cellules du système immunitaire. Ils sont produits dans la moelle osseuse et sont présents dans le sang, la lymphe, les organes lymphoïdes et dans de nombreux tissus conjonctifs de l'organisme. Dans le sang ils sont sphériques alors qu'ils sont déformés par leurs mouvements amiboïdes dans les tissus.

Les leucocytes sont classés en granulaires et en agranulaires, en fonction de la présence ou de l'absence de granules cytoplasmiques spécifiques. Ils sont aussi classés en mononucléaires et en polynucléaires, en fonction de la forme de leur noyau: les mononucléaires ont un noyau massif. Ils sont agranulaires et comprennent deux types de cellules:

1) les "monocytes", cellules macrophagiques circulantes et les "lymphocytes", support de l'immunité et de la mémoire immunitaire

2) les polynucléaires ont un noyau multilobé. Ils sont granulaires et classés en trois catégories d'après l'affinité tinctorielle de leurs granulations spécifiques : les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles et les polynucléaires basophiles.

Les adultes en bonne santé possèdent, normalement, entre 4,5 et 13,5 milliards de globules blancs par litre de sang. Chez les humains, on compte normalement 40 à 75% de polynucléaires neutrophiles, 1 à 5% de polynucléaires éosinophiles, moins de 1% de polynucléaires basophiles, 25 à 40% de lymphocytes et 2 à 10% de monocytes. Le nombre de leucocytes circulant augmente en cas d'infection ou de réaction inflammatoire.

## II.2 Morphologie et origine des polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont de taille moyenne. Leur diamètre est de 10 à 14  $\mu\text{m}$ . Leur noyau est formé de 2 à 5 lobes réunis par de fins étranglements. Le cytoplasme est finement granulaire et contient des grains azurophiles appelés granules primaires qui contiennent la myéloperoxydase et des agents bactéricides, la cathepsine G. Le cytoplasme contient aussi de nombreux granules spécifiques ou secondaires qui renferment de la lactoferrine, du lysozyme, de la phosphatase alcaline, et le cytochrome b558.

Les polynucléaires neutrophiles sont formés dans la moëlle osseuse après la maturation d'un myéloblaste. Il se spécialise au fur et à mesure de leurs divisions. Le nombre de polynucléaires neutrophiles est normalement compris entre 2000 à 7500 polynucléaires neutrophiles par  $\text{mm}^3$  de sang.

## II.3 Fonctions principales des polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont répartis en deux secteurs dans le sang :

1) le secteur circulant, qui est le seul mesuré directement lors de la prise de sang pour numération. Ils sont présents dans les gros vaisseaux sanguins et dans le courant axial des petits vaisseaux

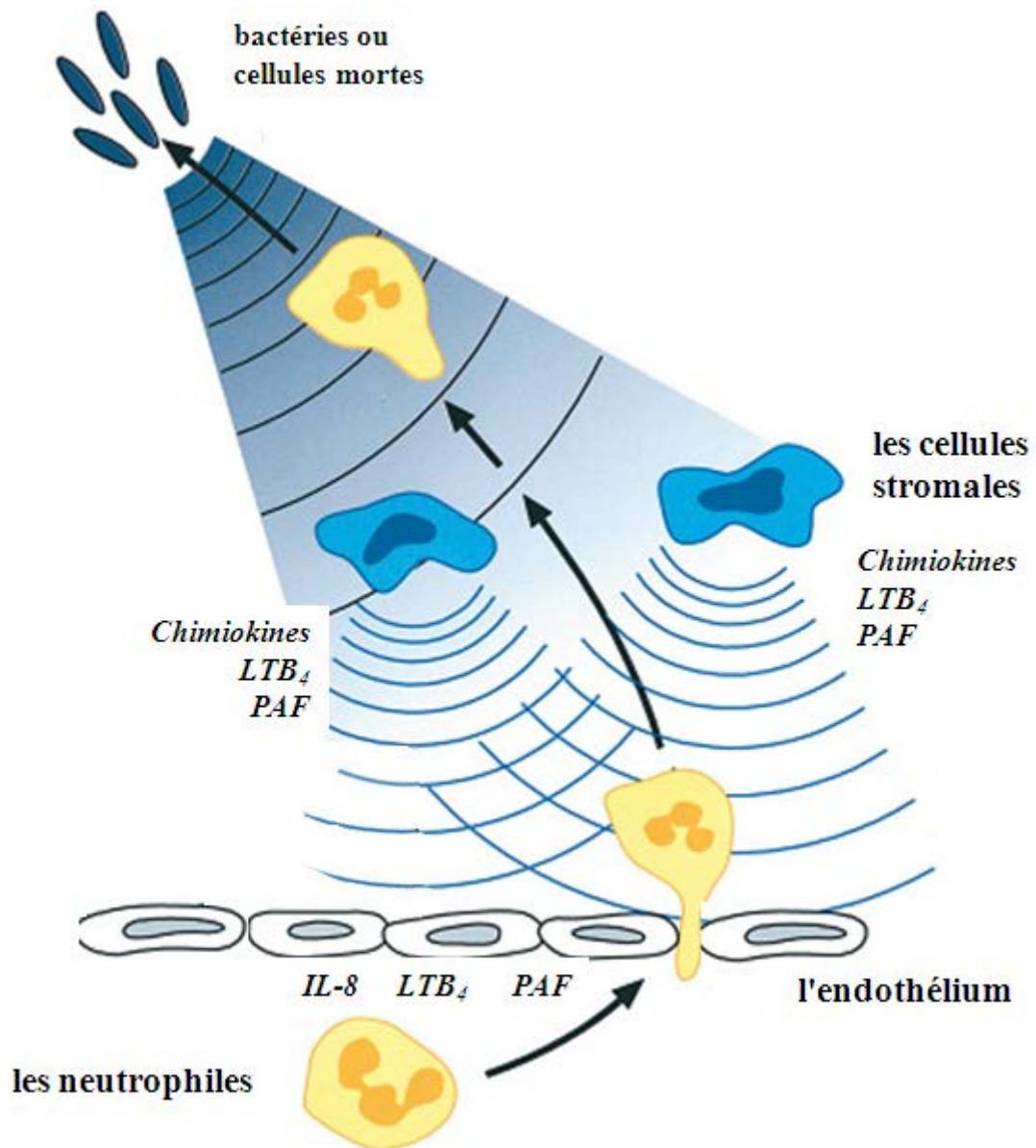
2) le secteur marginal, qui n'est pas mesuré bien qu'il représente une quantité égale au secteur circulant. En l'absence d'inflammation, le secteur marginal comporte les granulocytes transitoires arrêtés dans les poumons et dans les capillaires. Cette rétention physiologique des neutrophiles dans les capillaires n'implique pas leur adhésion (Doyle NA *et al.*, 1997).

A l'inverse, au niveau des sites d'inflammation, le trafic des neutrophiles implique leur séquestration au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires via une sélectine et une intégrine (Adams DH & Shaw S, 1994; Springer TA, 1994).

Les deux fonctions des neutrophiles (surveillance immunitaire et élimination *in situ* des micro-organismes ou des débris cellulaires) exigent une transition rapide entre

les formes non-adhérentes et adhérentes des neutrophiles, ce qui leur permet de migrer dans les tissus en cas d'inflammation. Le premier événement est l'apparition de nouvelles molécules d'adhésion sur l'endothélium adjacent au niveau du site de l'inflammation. Ces dernières sont induites par des médiateurs inflammatoires libérés dans les tissus endommagés. Elles permettent l'extravasation locale des leucocytes.

Les neutrophiles se déplacent à travers l'endothélium et dans les tissus pour atteindre la cellule cible ou les bactéries, guidés par des gradients de molécules chimiotactiques libérées par les cellules endothéliales ou par les cellules stromales activées (**Fig. 20**). Arrivés en contact avec les cellules cible ou les bactéries, les neutrophiles vont émettre des pseudopodes qui vont les entourer et les inclure dans le corps cellulaire des neutrophiles. Des vacuoles contenues dans les neutrophiles fusionnent alors avec la vacuole de phagocytose et les détruisent grâce aux substances bactéricides ou aux enzymes (lysozyme, hydrolase, phosphatase) présentes dans les phagocytes. Ce processus entraîne la mort du neutrophile par épuisement de leur stock en glucose. (Foxman EF *et al.*, 1999; Witko-Sarsat V *et al.*, 2000).



**Figure 20: Schéma de la migration chimiotactique des leucocytes vers un site d'inflammation (Witko-Sarsat V *et al.*, 2000)**

## **II.4 Les médiateurs de l'inflammation produits par les polynucléaires neutrophiles**

En plus de ses fonctions primaires, les polynucléaires neutrophiles sont aussi capables de sécréter des médiateurs servant à communiquer avec les cellules

environnantes. Ils sont souvent impliqués en premier lieu dans la réaction inflammatoire où ils déclenchent la réponse immunitaire avec le recrutement d'autres neutrophiles sur le site d'inflammation grâce à la production de médiateurs peptidiques et lipidiques.

#### **II.4.1 Médiateurs peptidiques: cytokines et chimiokines**

Les cytokines sont des peptides de faible masse moléculaire sécrétée par les cellules inflammatoires activés comme les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles. Au moins 15 différentes cytokines sont connues et impliqués dans le déclenchement, l'initiation, l'amplification et la régulation de la réponse inflammatoire. Elles déclenchent également la synthèse et la recharge dans le plasma des protéines de l'inflammation aiguë et sont associées à d'autres molécules de signalisation intra- et extra-cellulaire comme les glucocorticoïdes ou le monoxyde d'azote.

Lors d'une inflammation les polynucléaires neutrophiles agissent sur les cellules environnantes grâce aux cytokines et chimiokines produites. Elles ont de puissants effets pro-inflammatoires, en particulier l'IL-1 $\beta$  (Cassatella MA, 1995; Dinarello CA, 1996).

Les polynucléaires neutrophiles peuvent aussi produire du TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor) qui peut aussi être produit par d'autres cellules notamment par les monocytes ou les macrophages. L'induction du TNF- $\alpha$  initie le recrutement et à l'activation des cellules inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium, l'induction de l'explosion oxydative chez les leucocytes, la production de médiateurs inflammatoires comme les prostaglandines PGI<sub>2</sub>, le PGE<sub>2</sub>, l'IL-1 et d'autres cytokines (Driscoll KE, 2000).

L'IL-8, ou CXCL8, est sécrétée en grande quantité par les polynucléaires neutrophiles. Elle peut également être produite par les monocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales, épithéliales ou synoviales. Elle induit un changement de forme, une migration dirigée des polynucléaires neutrophiles, une dégranulation et une libération des protéines ainsi qu'une explosion oxydative des polynucléaires

neutrophiles. Son effet chimioattractant peut durer jusqu'à 10 heures (Baggiolini M & Clark-Lewis I, 1992).

Les MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (Macrophage Inflammatory Protein), ou CCL3 et CCL4 (Chemokine (C-C motif) ligand) sont produites respectivement par les polynucléaires neutrophiles et inductibles dans la plupart des cellules hématopoïétiques matures. Elles peuvent agir sur plusieurs types cellulaires: cellules NK (cellules Nature Killer), lymphocytes T, monocytes, basophiles, plaquettes, cellules dendritiques immatures et neutrophiles qui expriment fortement le CCR1 (chemokine (C-C motif) receptor). Cependant, MIP-1 $\beta$  a des effets plus faibles que MIP-1 $\alpha$  sur les NK et les monocytes, et n'agit pas sur les neutrophiles ni sur les basophiles. En plus de ces actions elles peuvent également augmenter le calcium intracellulaire et moduler la production des cytokines (Menten P *et al.*, 2002).

MIP-2 $\alpha$  est un puissant chimioattractant pour les polynucléaires neutrophiles et les monocytes (Fahey TJ 3rd *et al.*, 1990). Elle peut être produite par les macrophages, les neutrophiles, les cellules épithéliales et les fibroblastes (Driscoll KE *et al.*, 1993). Les MIP-3 sont impliquées dans le trafic des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes et les muqueuses, mais elles sont mieux connues pour leurs effets chimiotactiques sur les lymphocytes, et plus particulièrement sur les lymphocytes B et les T mémoire dans le cas de MIP-3 $\alpha$  (CCL20) (Scapini P *et al.*, 2001).

#### II.4.2 Médiateurs lipidiques

Les principaux éicosanoïdes issus du métabolisme de l'AA générés par le neutrophile sont le LTB<sub>4</sub> (Ford-Hutchinson AW *et al.*, 1980), la PGE<sub>2</sub> (Zurier RB, 1976) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Goldstein IM *et al.*, 1978). Les LTB<sub>4</sub> agissent au niveau des sites inflammatoires en augmentant l'adhésion aux cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire. Ils activent les neutrophiles et sont de puissants chimioattractants (Rosenberg HF & Gallin JI, 1999). La PGE<sub>2</sub> présente des actions pro- et anti-inflammatoires, en fonction de l'état de la cellule et de son récepteur. Le TXA<sub>2</sub> a des effets généralement pro-inflammatoires et vasoconstricteurs (James MJ *et al.*, 2001).

Lors de l'activation le neutrophile produit une élévation du calcium intracellulaire et l'enzyme cPLA2 se retrouve transloquée majoritairement à la membrane nucléaire. Elle clive préférentiellement les phospholipides ayant l'AA en position sn-2. L'AA libéré peut être utilisé principalement par deux voies métaboliques conduisant à la formation des leucotriènes et des prostanoïdes (voir § II.2.4 et II.1 dans Chapitre 1).

# **MATERIELS ET METHODES**



# Chapitre 1 : Matériels

## I. Produits

- Acétonitrile, éther diéthylique, hexane: SDS
- Acide acétique, chloroforme, dichlorométhane, éthanol, acétate d'éthyle, méthanol: CarloErba
- Acide arachidonique (AA), Acide alpha octadécatriénoïque ou acide  $\alpha$ -linoléique, (ALA): Sigma-Aldrich
- Acide-9(S)-hydroxy-10(E),12(Z),15(Z)-octadécatriénoïque(9(S)-HOTE): Interchim
- Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine (HEPES): Merck
- Albumine bovine: Sigma-Aldrich
- Borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ): Sigma-Aldrich
- Collagène : Nycomed
- COX-1 de mouton (E.C. 1.14.99.1): Sigma-Aldrich
- COX-2 recombinante humaine (E.C. 1.14.99.1): Sigma-Aldrich
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) : Sigma-Aldrich
- Ionophore calcique (A23187): Enzo
- Leucotriène  $\text{B}_4$ , 12-*épi* leucotriène  $\text{B}_4$ , 6-trans-leucotriène  $\text{B}_4$ , 8(S),15(S)-diHETE: Cayman
- sLOX (EC 1.13.11.12, Type 1-B): Sigma-Aldrich
- 15-LOX-2 recombinante humaine: Cayman
- Oxyde de platine ( $\text{PtO}_2$ ) : Sigma-Aldrich
- *N,O*-Bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA): Sigma-Aldrich
- Prostaglandines  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), Prostaglandines  $\text{D}_2$  ( $\text{PGD}_2$ ), Prostaglandin  $\text{E}_2$ - $\text{d}_4$  ( $\text{PGE}_2$ - $\text{d}_4$ ), Prostaglandin  $\text{D}_2$ - $\text{d}_4$  ( $\text{PGD}_2$ - $\text{d}_4$ ): Cayman
- 13(S)-HOTE and 9(S)-HOTE : Interchim

## II. Appareils

- Agrégomètre: Dual Aggro-meter, Chrono-log
- Balance : Mettler, Denver Instrument
- Cartouches C18 ; Chromabond-C18 : Macherey-Nagel
- Centrifugeuse : GR 4.11, Jouan.
- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) : Agilent Technologies
- Chromatographie liquide à haute performance, Series 1100 (HPLC): Agilent Technologies,
- Colonne Xbridge<sup>TM</sup> C18: (3.5µm, 4,6 x 150 mm): Waters
- Enregistreur, Linseis L250E
- Evaporateur rotatif: Rotavapor RE111: Büchi.
- Incubateur : Bioblock Scientific.
- pH-mètre , HANNA Ph 210 : Bioblock Scientific
- Plaques de chromatographie sur couche mince (silica gel G60) (200×200×0,25 mm) : Merck.
- Spectromètre résonance magnétique nucléaire (RMN): Bruker-Biospin
- SPE Vacuum Manifold Visiprep<sup>TM</sup> DL: Supelco.

## **Chapitre 2 : Méthodes**

### **I. Biosynthèse des acides gras mono- et di-hydroxylés**

#### **I.1 Biosynthèse des acides 9,16-dihydroxy-ALA**

Les acides 9,16-dihydroxy- et 13-monohydroxy-linoléniques sont préparés à partir de l'acide  $\alpha$ -linoléinique (ALA).

Les substrats (ALA) sont évaporés à sec sous azote et repris par 100  $\mu$ l d'éthanol et 48 ml de tampon borate de sodium 0,02 M, pH 9 à 0 °C. La réaction est catalysée par environ 10 mg d'enzyme (sLOX (E.C. 1.13.11.12, type 1-B)) en solution dans 2 ml de tampon borate.

L'enzyme est ajoutée au milieu réactionnel contenant les acides gras solubilisés dans le tampon borate. La réaction s'effectue à 0 °C pendant 60 min. Elle est arrêtée par l'addition de 10 mg de borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) apporté dans 2 ml de tampon borate. La réduction dure 15 min dans la glace sous agitation. Le mélange réactionnel est alors acidifié à pH 3 avec de l'acide acétique avant l'extraction des métabolites.

#### **I.2 Extraction en phase solide des métabolites oxygénés**

L'échantillon acidifié à pH 3 est déposé sur une cartouche de silice greffée C18 préalablement lavée successivement avec 5 ml d'éthanol afin d'éliminer les contaminants éventuels et 10 ml d'eau acide (pH 3) afin d'équilibrer la colonne avant le dépôt. Les acides gras mono- et di-hydroxylés sont élués avec 10 ml d'éthanol. L'échantillon est séché sous azote. Le résidu repris par 200  $\mu$ l d'éthanol est stocké sous azote à -20 °C.

### **I.3 Extraction liquide/liquide des métabolites oxygénés**

L'échantillon est acidifié à pH 3 par de l'acide acétique puis extrait par trois volumes d'éthanol et par six volumes de chloroforme. Après décantation, on récupère la phase organique inférieure. Une dixième extraction de la phase aqueuse est réalisée. Les phases organiques sont réunies puis évaporées sous vide. Le résidu est repris par 1 ml d'éthanol et stocké sous azote à -20 °C.

### **I.4 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des acides gras mono- et di-hydroxylés**

Les acides gras mono- et di-hydroxylés sont repris par 2 fois 200 µl d'un mélange éther diéthylique/méthanol (9:1, v/v) puis déposés sur une plaque de silice (silica gel 60, 20x20 cm). L'élution est réalisée avec un mélange de solvants : hexane/éther diéthylique/acide acétique (25:75:1; v/v/v). Les standards de migration et les produits lipidiques sont révélés en UV après pulvérisation de la plaque avec une solution de dichlorofluorescéine (2 mg dans 100 ml d'un mélange éthanol/eau (95:5; v/v)). Les lipides apparaissent sous la forme de tâches jaunes fluorescentes. Les zones de silice contenant les acides gras mono-hydroxylés (OH) et di-hydroxylés (diOH) sont grattées séparément puis les métabolites sont extraits 3 fois par 2 ml de méthanol. Les échantillons sont centrifugés à 600 g durant 5 minutes à température ambiante sous azote. La phase liquide est prélevée et évaporée à sec sous azote.

### **I.5 Analyse par HPLC des acides gras mono- et di-hydroxylés**

Les acides gras mono- et di-hydroxylés sont séparés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur une colonne de silice greffée C18 (Waters Xbridge™, 4,6x250 mm, 3,5 µm) thermostatée à 50 °C dans un four. L'élution utilise un gradient

constitué de deux solvants A et B à un débit de 1 ml/min. L'éluant A est un mélange acétonitrile/eau (1:9; v/v) acidifié à pH 3 par de l'acide acétique. L'éluant B est de l'acétonitrile de qualité HPLC. Un gradient a été mis en œuvre pour séparer correctement les métabolites di-hydroxylés dérivés de ALA. Pour séparer les acides gras 9,16-di-hydroxylés dérivés de l'ALA, l'éluant A est pompé pendant 5 min, puis il est progressivement remplacé par l'éluant B pour atteindre 20% à 10 min, 30% à 30 min, 60% à 50 min et 100% de B à 65 min. L'élution se poursuit avec l'éluant B seul pendant 15 min puis la colonne est rééquilibrée avec le solvant A. Les acides gras mono- et di-hydroxylés sont détectés avec un détecteur à barrette de diodes respectivement  $\lambda = 234$  nm (longueur d'onde correspondant au  $\lambda_{\text{max}}$  des diènes conjugués) et 270 nm (longueur d'onde correspondant au  $\lambda_{\text{max}}$  des triènes conjugués). Ces longueurs d'onde correspondent au maximum d'absorption de ces molécules.

## **I.6 Analyse par GC-MS des acides gras mono- et di-hydroxylés**

### **I.6.1 Préparation du diazométhane**

La méthylation des groupements carboxyliques libres s'effectue avec du diazométhane. 10 pastilles d'hydroxyde de potassium (KOH) sont solubilisées dans un mélange d'éther diéthylique/méthanol (3:6, v/v). Le diazométhane (gaz) est généré par l'addition d'environ 10 g de *N*-Nitroso-*N*-méthyl-4-toluènesulfonamide utilisé comme précurseur. Sa décomposition en présence de KOH forme du diazométhane gazeux qui est piégé dans 30 ml d'éther diéthylique stabilisé par 10 % de méthanol. La réaction est stoppée par l'addition d'acide acétique.

La solution saturée en diazométhane peut être conservée à l'obscurité pendant environ un mois.

### **I.6.2 Dérivation des acides gras mono- et di-hydroxylés**

Les 9,16-di-hydroxylés-ALA et 13-HOTE, séparées par HPLC sont collectés et évaporés à sec sous azote séparément. Puis ils sont méthylés pendant 15 min à

température ambiante par l'addition d'un ml de la solution d'éther diéthylique saturée en diazométhane selon la réaction :  $\text{RCOOH} + \text{CH}_2\text{N}_2 \Rightarrow \text{RCOOCH}_3 + \text{N}_2$ . Les échantillons sont ensuite évaporés sous azote et repris par 500  $\mu\text{l}$  de méthanol. Les molécules sont ensuite hydrogénées avec un flux d'hydrogène pendant 5 min en présence de quelques grains d'oxyde de platine ( $\text{PtO}_2$ ). On récupère le méthanol après une centrifugation de 5 min à 900 g. Le solvant est évaporé à sec sous azote. Le groupements hydroxylés de la molécule sont dérivés en éthers triméthylsilylés (TMS) par 100  $\mu\text{l}$  de *N,O*-bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) pendant 30 min à 60 °C.

### **I.6.3 Localisation par GC-MS des groupements hydroxyles présents sur la chaîne carbonée.**

Les molécules dérivées sont injectées dans un chromatographe en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (quadripôle) (GC-MS) Agilent Technologies. 1  $\mu\text{L}$  est injecté via un injecteur split-splitless chauffé à 260 °C dans une colonne DB17-MS (Agilent Technologies) 60 m x 0.25 mm avec un film de phase stationnaire de 0,25  $\mu\text{m}$ . La température du four est maintenue à 55 °C pendant 4 minutes puis elle augmente régulièrement jusqu'à 260 °C à raison de 20 °C/min puis de 260 °C à 300 °C à raison de 8 °C/min. Elle est maintenue à 300 °C pendant 15 min avant de redescendre à 55 °C pour une nouvelle analyse. Les molécules sont ionisés (70 eV), fragmentées et analysées par spectrométrie de masse (MS) en mode impact électronique (EI). L'hélium sert de gaz vecteur avec un débit de 1,2 ml/min. La température de la source est de 100 °C et le quadripôle et la ligne de transfert sont chauffés respectivement à 150 °C et 280 °C. L'acquisition des ions est réalisée sur la gamme de masses de 100 à 650 unité de masse atomique (uma).

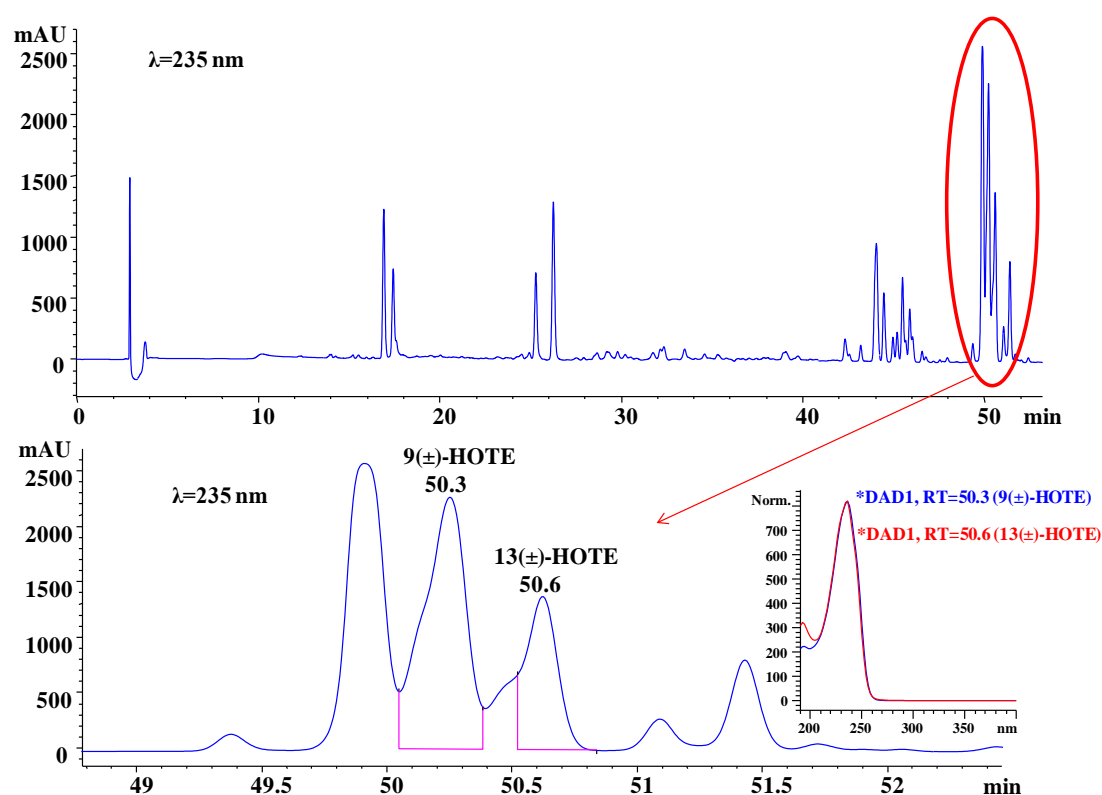
## I.7 Analyse par RMN des 9, 16-diHOTES

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un appareil Bruker-Biospin équipé d'une sonde cryogénique à 1000 MHz ( $^1\text{H}$ ). Tous les spectres ont été enregistrés à 298° K dans du  $\text{CDCl}_3$  avec du TMS (tétraméthylsilane) comme standard interne. Des séquences standard ont été utilisées pour les spectres 1D, DQF COSY (Piantini U *et al.*, 1982; Shaka A J & Freeman R, 1983; Derome AE & Williamson MP, 1990) et résolution J (Aue WP *et al.*, 1976; Nagayama K *et al.*, 1978; Wider G *et al.*, 1981). La durée d'impulsion  $^1\text{H}$  était de 9,0  $\mu\text{s}$ ; des temps de 1 s et 5 s ont été utilisés comme temps d'évolution pour les spectres de résolution J et COSY. Afin de simplifier certaines constantes de couplage, un faible découplage sélectif de 270 Hz pendant le temps d'acquisition (900 ms) a été utilisé lors des expériences de découplage homonucléaire en 1D. Les spectres 2D COSY DQF ont été enregistrés avec 8 passages et des points réels 2048 x 1024 (F2xF1) avec des temps d'acquisition de 114 ms et 57 ms pour les dimensions directs et indirects. Les spectres 2D de résolution J ont été enregistrés avec 16 passages et des points réels 8192 x 256, avec des temps d'acquisition de 458 ms dans la dimension directe et 1280 ms dans la dimension indirecte (couplage J). Les Spectres de COSY ont été traités avec une matrice de points 4096 x 4096 avec les fonctions cosinus carré et sinus carré pour les dimensions directs et indirects. Les spectres 2D de résolution J ont été traités avec une matrice de point 8192 x 2018 avec la fonction cosinus carré pour les deux dimensions.

## I.8 Préparation du 9(±)-HOTE racémique à partir de l'ALA

5  $\mu\text{moles}$  d'ALA secs sont chauffés sous atmosphère d'oxygène à 60°C pendant 1h. La réaction est arrêtée par l'addition de  $\text{NaBH}_4$  (10 mg) dans 2 ml de tampon borate 0.02 M, pH 9.0). La réduction dure 15 min dans la glace sous agitation. Après acidification à pH 3 avec de l'acide acétique les métabolites oxygénés formés sont extraits par 6 ml d'éthanol et 12 ml de chloroforme. Les phases organiques sont

évaporées à sec sous azote. Le racémique 9(±)-HOTE est analysé par HPLC selon les procédures décrites au paragraphe I.5 dans « Matériels et Méthodes » (**Fig. 21**).



**Figure 21: Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant la séparation du 9(±)-HOTE racémique synthétisé par l'oxygène à partir de l'ALA**

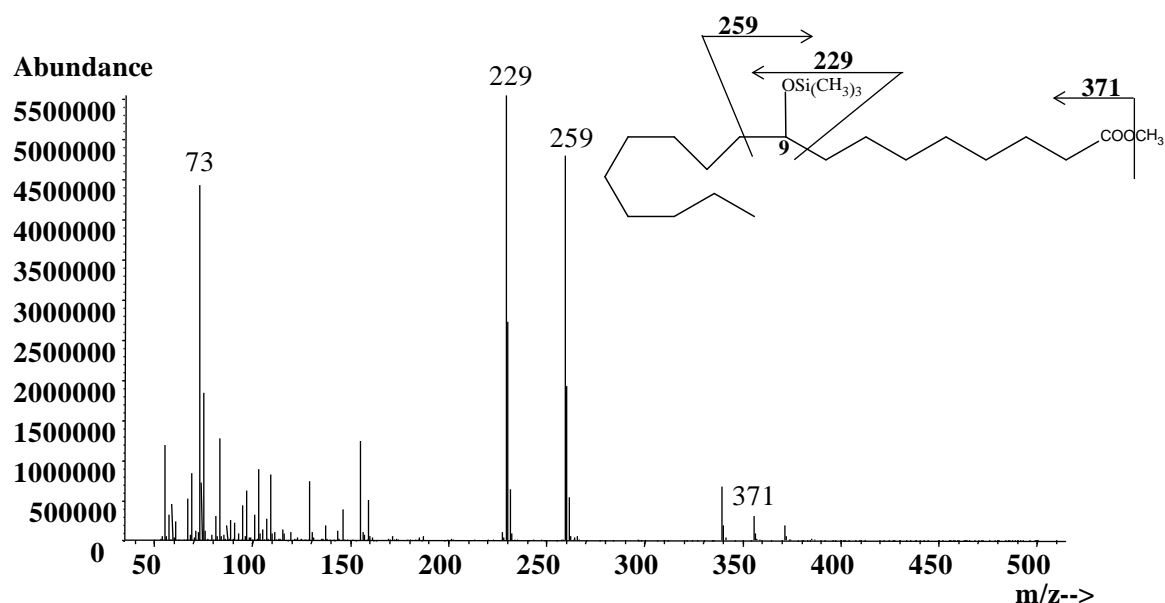
*Pour les conditions opératoires se reporter au paragraphe I.5 dans « Matériels et Méthodes ».*

Le racémique 9(±)-HOTE purifié par HPLC a été méthylié au diazométhane, hydrogéné puis dérivé sous forme d'éther triméthylsilylé selon les procédures décrites au paragraphe I.6.2 dans « Matériels et Méthodes » et analysé par GC-MS en mode d'ionisation impact électronique (EI).

Le spectre de masse du 9(±)-HODE après dérivation (**Fig. 22**) montre des ions caractéristiques à  $m/z$ : 371 (M-15) (perte de  $\text{CH}_3$ ), 229 ( $\text{TMS-O-CH-(CH}_2)_8\text{-CH}_3$ ), et 259 ( $\text{TMS-O-CH-(CH}_2)_7\text{-COOCH}_3$ ) et 73 (TMS). Cette fragmentation indique clairement la présence du groupement hydroxyle sur le carbone 9. Ce résultat nous



permet d'affirmer que l'ALA a bien été converti par cette méthode en 9(±)-HOTE racémique.



**Figure 22: Spectre de masse en impact électronique du 9(±)-HOTE racémique synthétisé chimiquement en présence d'oxygène à partir de l'ALA après dérivation et hydrogénation**

## I.9 Incubation de l'ALA et 9(S)-HOTE avec la 15-LOX-2 recombinante humaine

L'ALA et le 9(S)-HOTE ont été incubés séparément avec la 15-LOX-2 recombinante humaine dans un volume de 500 µl tampon de Tris-HCl (0,05 M, pH 7,2 avec 0,003 % de Tween) à 30°C selon les méthodes décrites précédemment par Kühn H *et al* et Shappell SB *et al* (Kühn H *et al.*, 1993; Shappell SB *et al.*, 2001). La réaction catalysée par environ 50 µg d'enzyme (15-LOX-2 recombinante humaine) est réalisée en solution dans 50 µl de tampon Tris-HCl. L'ALA ou le 9(S)-HOTE sont pré-incubés pendant 1 min et l'enzyme est ajoutée progressivement. La réaction s'effectue à 30°C

pendant 30 min. Les hydroperoxydes obtenus sont réduits par  $\text{NaBH}_4$ . Les lipides sont extraits après acidification à pH 3 avec de l'acide acétique et les métabolites dihydroxylés sont purifiés par l'HPLC (voir le paragraphe I.5 dans « Matériels et Méthodes »).

## **II. Isolement des plaquettes sanguines humaines**

Les plaquettes sanguines humaines sont isolées selon la méthode de Lagarde M. *et al* (Lagarde M *et al.*, 1980). Le sang acheté à “Etablissement Français du Sang” (EFS), est réparti dans des tubes plastiques de 50 ml et centrifugé à 200 g durant 17 min à 20°C. Le culot contenant les globules blancs et les érythrocytes est conservé pour isoler les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) (voir le paragraphe III dans « Matériels et Méthodes »).

Le surnageant, correspondant au plasma riche en plaquettes (PRP) est prélevé puis acidifié à pH 6,4 par l'acide citrique 0,15 M afin d'éviter l'agrégation spontanée des plaquettes. Le PRP, réparti dans des tubes à ailettes de 7 mL, est centrifugé à 900 g pendant 12 minutes à 20°C. Pour chaque tube, le surnageant est enlevé avec précaution et chaque culot plaquettaire est repris par 5 ml de tampon Tyrodes HEPES (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM,  $\text{NaHCO}_3$  12 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,41 mM, HEPES 5 mM, et glucose 5,5 mM, pH 7,35). La suspension plaquettaire (environ  $2$  à  $5 \times 10^8$  plaquettes/ml) est conservée à 18°C et les plaquettes restent fonctionnelles plusieurs heures.

## **III. Isolement des leucocytes polymorphonucléaires**

10 mL de dextran (0.1 mM) préparé dans du sérum physiologique (154 mM) sont ajoutés dans chaque tube contenant les culots (globules rouges, leucocytes et

monocytes) (Maclouf J *et al.*, 1982). Ils sont agités délicatement par une succession de retournements puis inclinés à 45° pendant une heure et demie à température ambiante pour sédimenter les globules rouges. La phase supérieure est collectée dans des tubes plastiques de 50 ml et centrifugée à 400 g pendant 10 min. Le surnageant de chaque tube est enlevé et les culots de leucocytes et monocytes contaminés par des globules rouges sont repris séparément par 10 ml de tampon Tyrodes HEPES. La suspension est ensuite déposée délicatement par fraction de 10 ml sur 10 ml de Ficoll-Paque Plus (1,077 g/l). Après centrifugation à 400 g pendant 20 min, la couche supérieure est enlevée. Les culots sont ensuite remis en suspension dans 21 ml d'eau distillée et agités doucement (vortex) pendant 20 s pour lyser les globules rouges. 4 ml d'une solution de chlorure de sodium (45 g/l) sont immédiatement ajoutés pour restaurer l'osmolarité de la suspension leucocytaire. La suspension est centrifugée à 200 g pendant 12 min, et le surnageant est enlevé. Les culots de leucocytes sont repris dans une solution de Tyrodes HEPES (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,41 mM, HEPES 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM et 0,1 % glucose, pH 7,35). Du chlorure de calcium (concentration finale de 2 mM) est ajouté dans la suspension leucocytaire avant l'incubation. La suspension leucocytaire peut être stockée pendant un mois à -20 °C, l'activité 5- LOX est conservée.

#### **IV. Mesure de l'agrégation des plaquettes sanguines humaines induite par le collagène**

L'activité plaquettaire est testée en mesurant la capacité des plaquettes à s'agréger les unes aux autres en présence de l'agent inducteur utilisé: le collagène. L'agrégation plaquettaire est mesurée avec un agrégomètre Chrono-log à double pistes, équipé d'un enregistreur. Cette technique est basée sur la méthode de Born (Born GV, 1962). Le changement de transmission de la lumière est détecté par une cellule photoélectrique. L'enregistrement du signal permet de suivre la cinétique de l'agrégation.

Les plaquettes sont pré-incubées à 37°C pendant 1 min, puis incubées avec les molécules à tester pendant 1 min. L'éthanol est utilisé comme contrôle. L'agrégation

est déclenchée par l'ajout de collagène. Le collagène est préparé dans une solution contenant 5% glucose vendue par le fabricant. Son pH est compris entre 2,7 et 2,9. Le volume de la solution de collagène est ajusté pour obtenir pour les plaquettes contrôle environ 70% d'agrégation (courbe contrôle). La concentration finale de collagène est comprise entre 0,05 ng/ $\mu$ l et 0,20 ng/ $\mu$ l selon les donneurs. L'agrégation est mesurée durant 4 min à 37°C. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la différence entre le pourcentage d'agrégation de la courbe contrôle et celui obtenu en présence des molécules testées.

## **V. Incubation 9,16-diHOTEs avec des leucocytes polymorphonucléaires**

Les leucocytes humains isolés, en suspension dans un tampon de Tyrode-HEPES (2 ml) contenant 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  ont été pré-incubés en présence ou en l'absence de différents isomères de 9,16-diHOTEs pendant 3 min à 37°C. Ils sont ensuite activés pendant 10 min avec 1  $\mu$ M d'ionophore A23187 et 10  $\mu$ M d'acide arachidonique. La réaction est arrêtée par acidification à pH 3 avec de l'acide acétique et 1.5 nmoles de 8(S),15(S)-diHETE sont ajoutés comme standards internes pour la quantification en HPLC. Les métabolites oxygénés sont ensuite extraits sur une cartouche de silice greffée C18 (phase solide) et analysés par l'HPLC comme décrit précédemment.

## **VI. Mesure de marqueurs de l'inflammation : prostaglandines $E_2$ et $D_2$ produites par la COX-1 de mouton et la COX-2 recombinante humaine incubées avec les acides gras di-hydroxylés synthétisés à partir de l'ALA**

### **VI.1 Biosynthèse des prostaglandines $E_2$ et $D_2$ produites par la COX-1 et la COX-2**

Les enzymes commerciales COX-1 et COX-2 ont pré-incubées à 37°C pendant 15 min dans un 500 µl tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8.1 en présence ou non de 1 µM des différents isomères 9,16-diHOTES puis incubées pendant 10 min avec 10 µM d'acide arachidonique utilisé comme un substrat. De l'albumine est ajoutée (concentration finale de 45 g/l) pour améliorer la formation de la prostaglandine D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) selon la méthode décrit par Watanabe T. et al (Watanabe T *et al.*, 1982).

Après acidification à pH 3 avec de l'acide acétique, 20 ng de PGD<sub>2</sub> et E<sub>2</sub> deutériées (PGD<sub>2</sub>-d<sub>4</sub>) et (PGE<sub>2</sub>-d<sub>4</sub>) sont ajoutés comme standards internes pour la quantification en GC-MS. Les prostaglandines sont extraites par 10 volumes acétate d'éthyle. L'échantillon est centrifugé à 650 g pendant 5 min à température ambiante. La phase organique supérieure est récupérée dans un tube conique. L'extraction est répétée trois fois. Les phases organiques sont rassemblées et évaporées à sec sous azote.

## VI.2 Dérivation des prostaglandines E<sub>2</sub> et D<sub>2</sub>

Les prostaglandines subissent trois dérivations successives :

- (1) une méthyoxymation des groupements carbonyles
- (2) une estérification de la fonction carboxylique
- (3) une silylation des groupements hydroxyles

(1) Méthoxylation : Les échantillons secs sont traités à température ambiante pendant toute la nuit par 50µL de chlorhydrate de méthoxylamine (MOX) à 5 mg/ml dans la pyridine anhydre puis évaporés à sec sous azote. Le dichlorométhane a ajouté aux échantillons au cours de l'évaporation. Il agit comme un azéotrope pour éliminer les éventuelles traces d'eau.

(2) Estérification : Les échantillons secs sont repris 60 µl d'acétonitrile, 20 µl de pentafluorobenzyl bromide (PFB) préparé à 35% dans de l'acétonitrile et 20 µl de N-éthyl diisopropylamine (DIPE) sert de catalyseur en captant les protons formés au cours de la réaction qui s'effectue à 37°C pendant 30 min.

(3) Silylation : Après évaporation à sec sous azote les échantillons sont incubés pendant 60 min à 60°C en présence de 100 µl de *N,O*-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA).

Les échantillons ainsi dérivés sous forme méthoxy, pentafluorobenzylés et triméthylsilylés (MO-PFB-TMS) sont évaporés à sec sous azote et repris dans 20 µL d'un mélange hexane anhydre/BSTFA (9:1, v:v) avant leur analyse en GC-MS.

### **VI.3 Analyse des prostaglandines par GC-MS**

Les prostaglandines dérivées (MO-PFB-TMS) (1 µl) sont injectées avec un injecteur split-splitless. La colonne capillaire HP-5MS utilisée a une longueur de 60 m et un diamètre de 0,25 mm. Elle est recouverte intérieurement d'un film de phase stationnaire apolaire de phényl méthyl siloxane de 0,25 µm d'épaisseur. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 1 ml/min. Les injections sont réalisées à 260 °C, la température du four étant maintenue à 57°C pendant 2 min puis elle augmente jusqu'à 180°C à raison de 20°C/min et jusqu'à 280°C à raison de 4°C / min. Cette température est maintenue constante pendant 15 minutes. Les prostaglandines sont analysées en utilisant le mode d'ionisation chimique négative (NICI, "Negative ion chemical ionization") et le mode de sélection d'ion (SIM). On mesure les ions  $[M-181]^-$  correspondant à la perte du groupe PFB soit l'ion à  $m/z$ : 524 pour PGD<sub>2</sub> et E<sub>2</sub> dérivées et  $m/z$ : 528 pour leurs standards internes deutériés dérivés correspondant.

## **VII. Analyse statistique des résultats**

Les valeurs présentées dans les figures et dans les tableaux sont la moyenne  $\pm$  SEM de  $n$  expériences indépendantes ( $n \geq 4$ ). Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du test  $t$  apparié. Les variations sont considérées comme significatives si la

valeur de  $P$  est inférieure ou égale à 0,05. One-way ANOVA a été utilisée pour évaluer les différences entre les groupes.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**



## I. Caractérisation des métabolites oxygénés dérivés de l'ALA (18:3n-3)

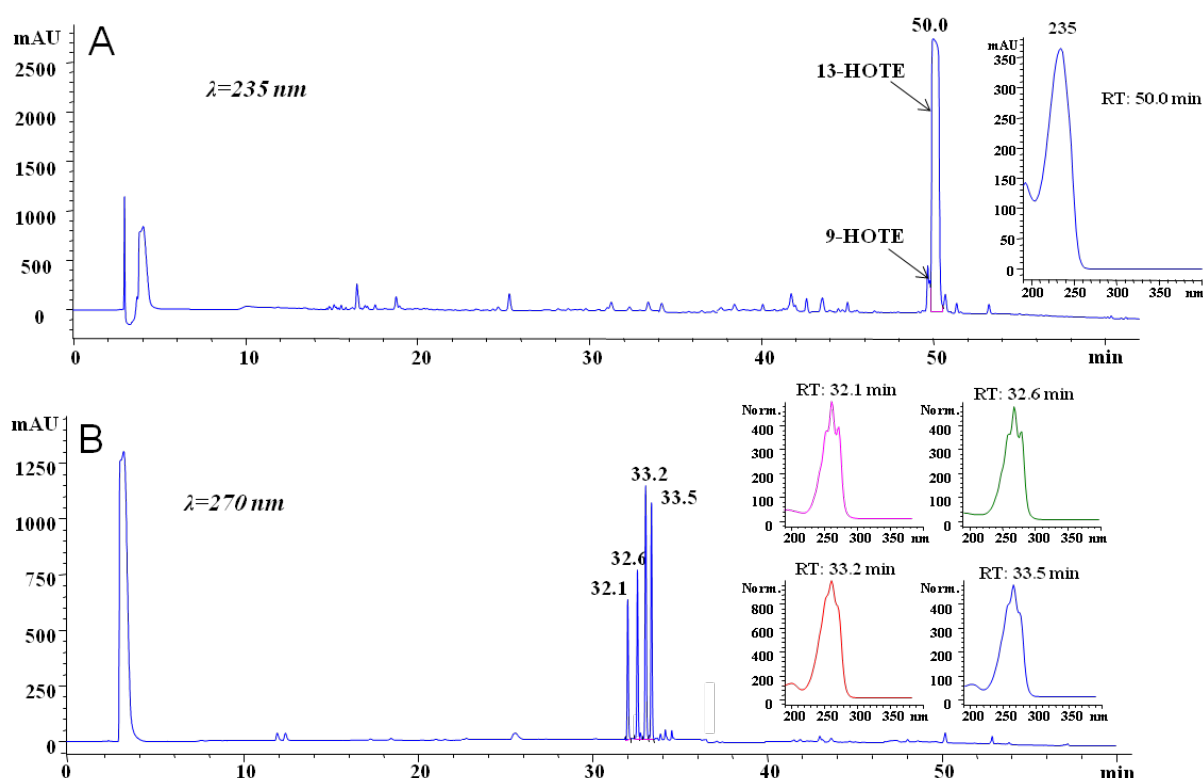
### I.1 Analyse chromatographique des métabolites dérivés de l'ALA

Les métabolites formés à partir de l'ALA via la sLOX ont été extraits puis analysés par HPLC (**Fig. 23**) selon les procédures décrites au paragraphe I.5 dans « Matériels et Méthodes ».

Le métabolite principal élué à 50,0 min (**Fig. 23A**) présente un spectre UV caractéristique des acides gras mono-hydroxylés avec un maximum d'absorption à  $\lambda = 235$  nm qui signe la présence d'un diène conjugué. Son temps de rétention correspond à celui du 13(S)-HOTE commercial analysé dans les mêmes conditions. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui rapporte que la sLOX génère presque exclusivement du 13(S)-HOTE à partir de l'ALA (Van Os CPA, *et al.*, 1981). Il a aussi été montré que la sLOX synthétise de l'acide 13(S)-hydroxyoctadécadiénoïque (13-HODE) à partir du 18:2n-6 et de l'acide 15(S)-hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) à partir de l'AA (Funk MO *et al.*, 1976). Le métabolite mono-hydroxylé formé à partir de l'ALA est donc du 13(S)-HOTE.

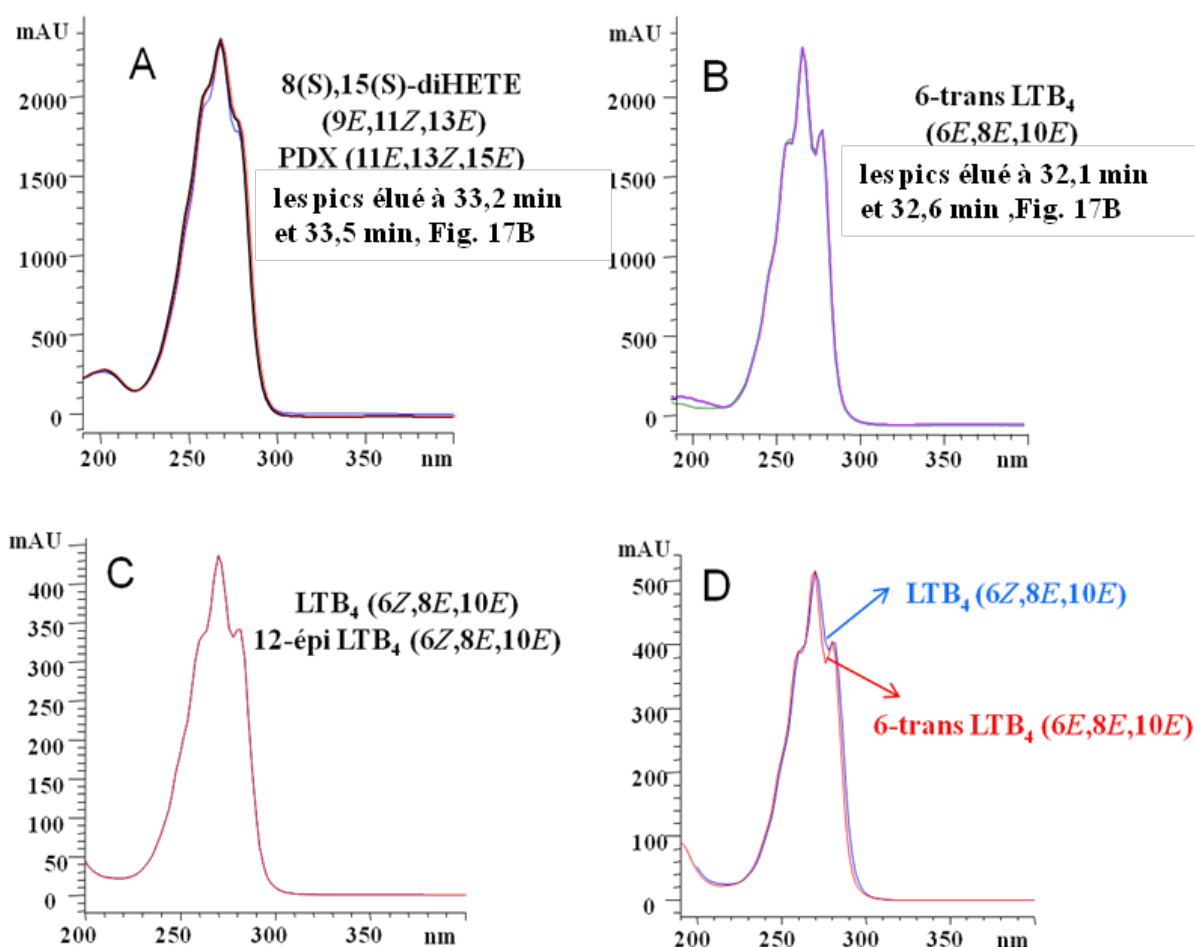
Contrairement au DHA, qui est converti en un seul métabolite di-hydroxylé, la PDX, quatre acides gras di-hydroxylés, élués à 32,1 min, 32,6 min, 33,2 min et 33,5 min, ont été détectés avec le 18:3n-3 en présence de sLOX (**Fig. 23B**). Ils présentent tous un spectre UV caractéristique avec un maximum d'absorption à  $\lambda = 270$  nm avec deux d'épaulements à  $\lambda = 260$  nm et  $\lambda = 280$  nm, qui indique la présence d'un triène conjugué. En outre, on note que les spectres UV de deux d'entre eux (élué à 33,2 min et 33,5 min) sont superposables à celui de la PDX avec l'épaulement de gauche qui est plus élevé que celui de droite. Cette même dissymétrie est également retrouvée dans les spectres UV d'autres acides gras di-hydroxylés comme le 8(S),15(S)-diHETE ou le 5(S),12(S)-diHETE qui présentent la même géométrie *E/Z/E* des doubles liaisons de leur triène conjugué (**Fig. 24A**). Cette observation spectrale suggère que la géométrie des doubles liaisons du triène conjugué des composés élués à 33,2 min et 33,5 min est vraisemblablement *E/Z/E*. Les métabolites élués à 32,1 min et à 32,6 min ont des spectres UV identiques au 6-trans LTB<sub>4</sub> et à son isomère 6-trans-12-épi LTB<sub>4</sub> qui

présentent une géométrie *E/E/E* de leur triène (**Fig. 24B**). Les épaulements de gauche et de droite caractéristiques des triènes sont pratiquement au même niveau (**Fig. 24B**). Leurs spectres UV sont quasi superposables avec les spectres UV du 12-*épi* LTB<sub>4</sub> (*Z/E/E*) (**Fig. 24C**) et du 6-*trans*-12-*épi* LTB<sub>4</sub> (*E/E/E*) (**Fig. 24D**). Ces résultats suggèrent que la géométrie des doubles liaisons du triène conjugué des métabolites élués à 32,1 min et à 32,6 min serait tout *trans* (*E/E/E*) comme le montreront les études de RMN décrites dans ce chapitre au paragraphe I.4.



**Figure 23: Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant les différents métabolites synthétisés par la sLOX à partir de l'ALA**

*Pour les conditions opératoires se reporter au paragraphe I.5 dans « Matériels et Méthodes ». (A) acides gras mono-hydroxylés ( $\lambda = 235$  nm) ; (B) acides gras dihydroxylés ( $\lambda = 270$  nm).*



**Figure 24: Comparaison des spectres UV de différents acides gras di-hydroxylés commerciaux séparés par HPLC**

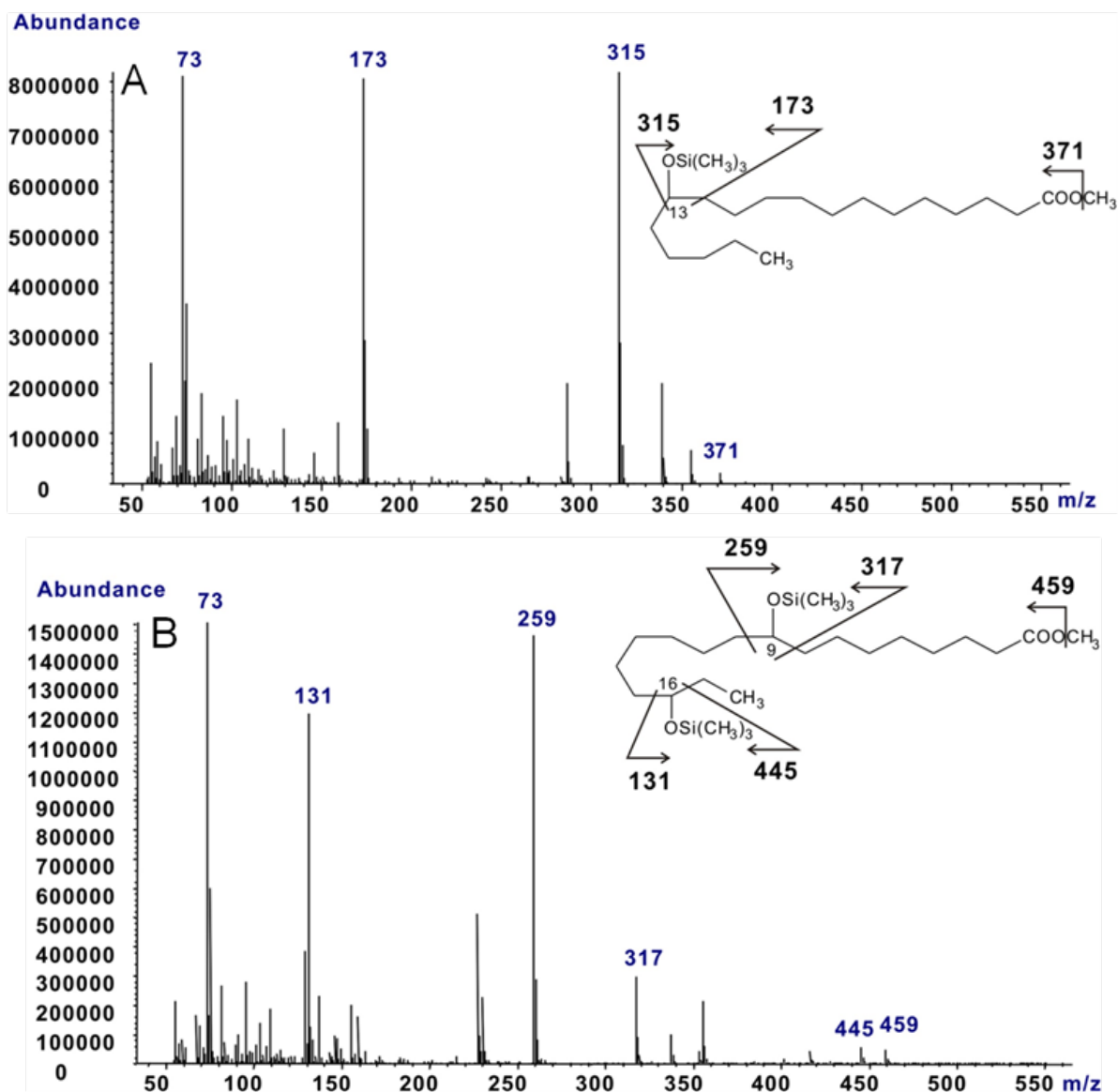
## I.2 Localisation des groupements hydroxylés sur la chaîne hydrocarbonée

Les acides gras mono- ou di-hydroxylés de l'ALA purifiée par HPLC ont été méthylés au diazométhane, hydrogénés puis dérivés sous forme d'éthers triméthylsilylés selon les procédures décrites au paragraphe I.6.2 dans « Matériels et Méthodes » et analysés par GC-MS en mode d'ionisation impact électronique (EI).

Le spectre de masse du 13-HOTE après dérivation (**Fig. 25A**) montre des ions caractéristiques à  $m/z$ : 371 (M-15), (perte de  $\text{CH}_3$ ), 315 (M-71) qui correspond à la perte de  $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH}_3$ , et 173 ( $\text{TMS-O-CH-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_3$ ). Cette fragmentation indique clairement la présence du groupement hydroxylé sur le carbone 13. Ce résultat

nous permet d'affirmer que l'ALA est transformé par la sLOX après la réduction de l'hydroperoxyde en l'acide-13(S)-hydroxy-9Z,11E,15Z-octadécatriénoïque.

Les quatre composés di-hydroxylés dérivés de l'ALA présentent (**Fig. 25B**) des spectres de masse identiques avec les ions caractéristiques à  $m/z$ : 459 (M-15, perte de  $\text{CH}_3$ ), 445 (M-29, perte de  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 317 (M-157, perte de  $\text{CH}_2\text{-(CH}_2)_6\text{-COOCH}_3$ ), 259 ( $\text{TMS-O-CH-(CH}_2)_7\text{-COOCH}_3$ ), 131 ( $\text{TMS-O-CH-CH}_2\text{-CH}_3$ ) et 73 (TMS) qui indiquent une oxygénation sur les carbones 9 et 16. Ce résultat nous permet d'affirmer que tous les composés di-hydroxylés de l'ALA sont des acides 9,16-dihydroxy-octadécatriénoïques (9,16-diHOTE).

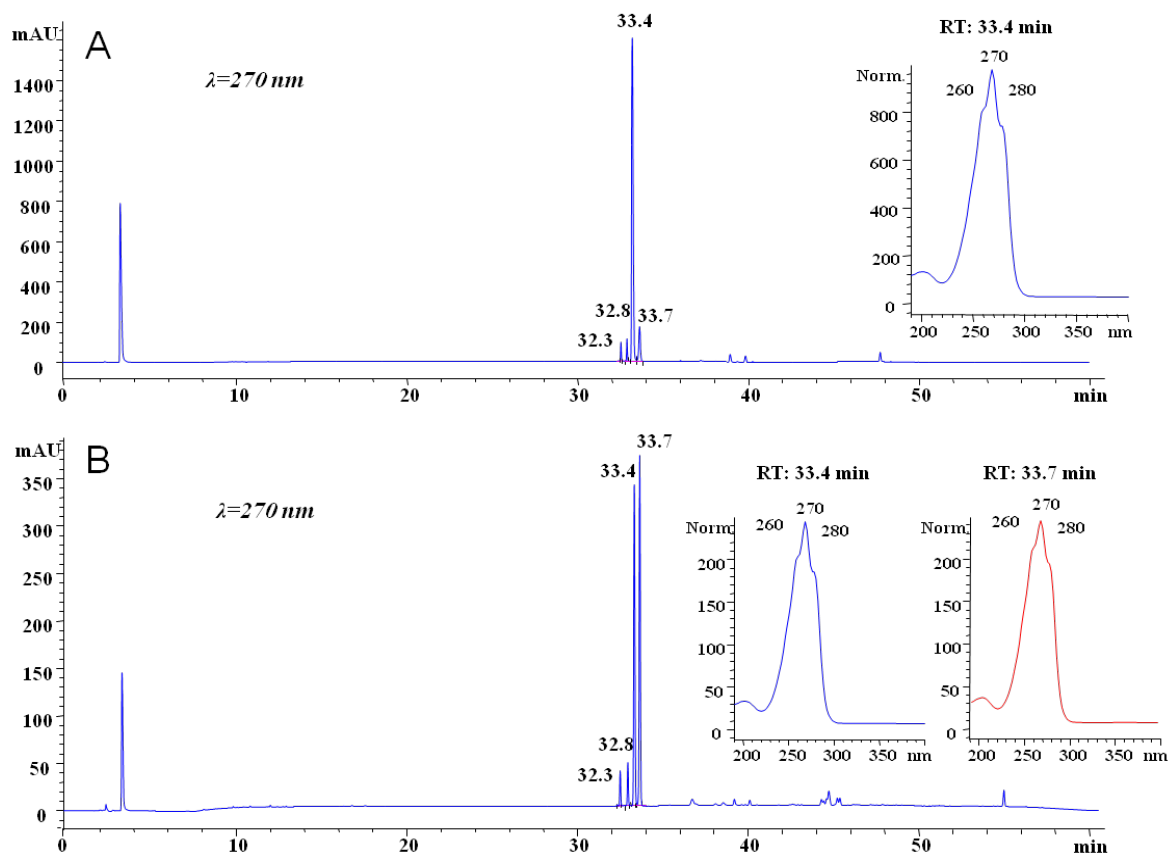


**Figure 25: Spectre de masse en impact électronique des métabolites mono- et di-hydroxylé dérivés de l'ALA après dérivation et hydrogénation**

(A) HOTE hydrogéné synthétisé à partir d'ALA par sLOX; (B) diHOTE hydrogéné synthétisé à partir d'ALA par sLOX.

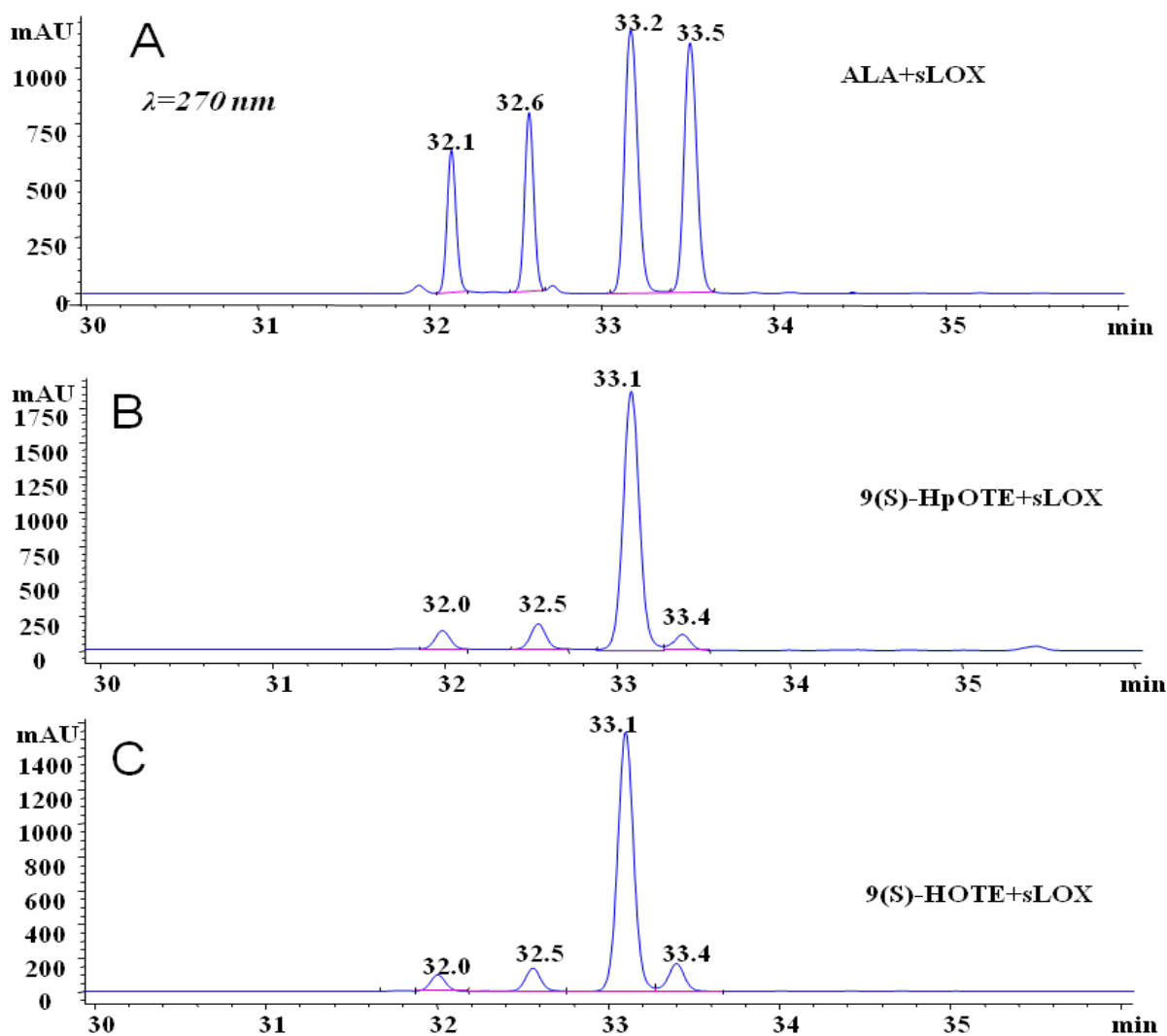
### I.3 Détermination de la stéréochimie des carbones 9 et 16 des métabolites di-hydroxylés dérivés de l'ALA

Du 9(S)-HOTE commercial et du 9( $\pm$ )-HOTE (racémique préparé selon les procédures décrites au paragraphe I.8 dans « Matériels et Méthodes ») ont été incubés séparément avec sLOX. Le 9(S)-HOTE a été métabolisé en un composé principal élué à 33,4 min (**Fig. 26A**). Ce métabolite 9(S),16(S)-diHOTE est aussi formé à partir de l'ALA et est élué avec quasi le même temps de rétention à 33,2 min (**Fig. 27A**) (au glissement des temps de rétention près). L'autre métabolite issu du 9( $\pm$ )-HOTE et élué à 33,7 min (**Fig. 26B**) n'est pratiquement pas présent lorsque l'on incube la sLOX avec le 9(S)-HOTE (**Fig. 26A**). Il s'agit donc du 9(R),16(S)-diHOTE. Son temps de rétention correspond (au glissement des temps de rétention près) à celui du composé issu de l'ALA et élué à 33,5 min (**Fig. 27A**). On en déduit donc que les deux isomères issus de l'ALA élués à 33,2 et 33,5 min (**Fig. 27A**) sont respectivement 9(S),16(S)-et 9(R),16(S)-diHOTE. En effet, le 9(S),16(S)-diHOTE (**Fig. 27A**) est retrouvé au même temps de rétention que les produits de dioxygénation formés respectivement à partir du 9(S)-HpOTE (**Fig. 27B**) et du 9(S)-HOTE (**Fig. 27C**). Le pic élué à 33,5 min (**Fig. 27A**) ne peut être que le diastéréoisomère 9(R),16(S)-diHOTE; il n'est pas présent dans les chromatogrammes (**Fig. 27B et 27C**) obtenus à partir de l'oxygénation du 9(S)-HpOTE et du 9(S)-HOTE.



**Figure 26 : Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant les différents métabolites synthétisés à partir de 9(S)-HOTE et de 9(±)-HOTE via la sLOX**

*Les conditions opératoires sont décrites au paragraphe 1.5 dans « Matériels et Méthodes ». (A) 9(S),16(S)-diHOTE synthétisé à partir de 9(S)-HOTE par la sLOX ; (B) 9(S),16(S)-diHOTE et 9(R),16(S)-diHOTE synthétisés à partir de 9(±)-HOTE par sLOX.*



**Figure 27: Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant les différents métabolites synthétisés à partir de l'ALA, du 9(S)-HpOTE et du 9(S)-HOTE via la sLOX**

*Les conditions opératoires sont décrites au paragraphe I.5 dans « Matériels et Méthodes ». 9,16-diHOTES synthétisé à partir de L'ALA (A); du 9(S)-HpOTE (B); et du 9(S)-HOTE (C).*

Si la stéréochimie des carbones asymétriques des deux isomères avec des triènes *E,Z,E* a été assez facile à établir, celle des deux autres isomères tout trans élués à 32,1 et 32,6 min (**Fig. 27A**) est moins évidente. En se basant sur les données de la littérature on peut néanmoins suggérer que l'ordre d'éluion de ces composé élués à 32,1 m et 32,6 min soit respectivement 9(R),16(S)-di-HOTE et 9(S),16(S)-di-HOTE. En effet des études antérieures utilisant des synthèses chimiques de molécules similaires avec



des stéréochimies bien définies ont montré que le 8(R),15(S)-*E,E,E*-diHETE était élué avant le 8(S),15(S)-*E,E,E*-diHETE (Maas RL & Brash AR, 1983; Maas RL *et al.*, 1981). De même, le 5(S),12(R)-*E,E,E*-LTB<sub>4</sub> était élué avant le 5(S),12(S)-*E,E,E*-LTB<sub>4</sub> et le 5(S),12(R)-*E,E,E*-LTB<sub>5</sub> précédait le 5(S),12(S)-*E,E,E*-LTB<sub>5</sub> (Lee CW *et al.*, 1982; Mencia-Huerta JM *et al.*, 1983; Lee TH *et al.*, 1984).

#### I.4 Détermination de la géométrie des doubles liaisons par RMN à haut champ

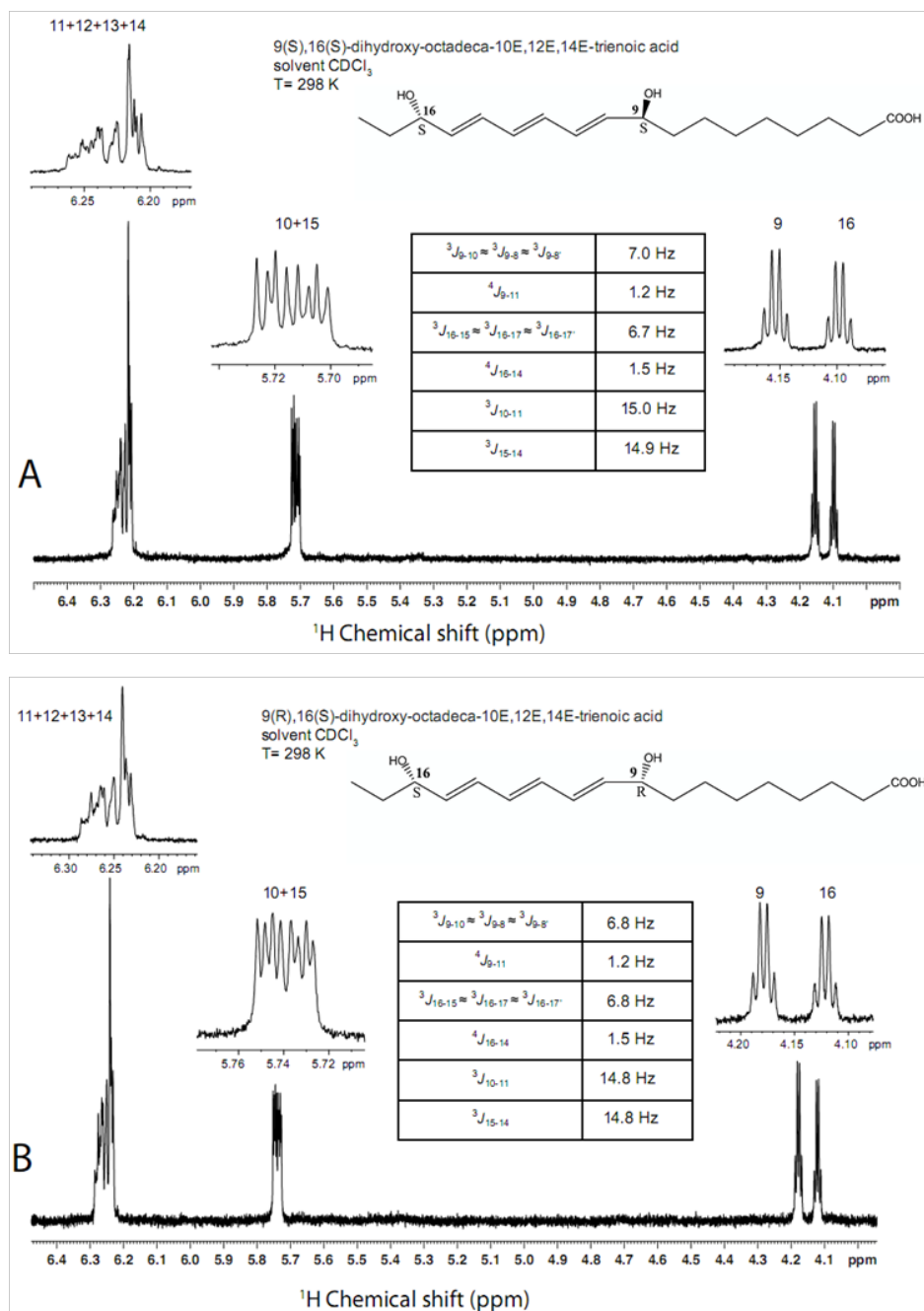
Les analyses RMN à très haut champ ont été réalisées par M. Moreno Lelli au Centre de RMN à Très Hauts Champs de l'Institut des Sciences Analytiques UMR 5280 CNRS/Université Lyon 1/ENS-Lyon en vue de déterminer la configuration *cis* (*Z*) ou *trans* (*E*) des doubles liaisons des triènes conjugués présents dans les 4 isomères 9,16-HOTE. Leurs structures ont été vérifiées en examinant l'attribution des protons liés aux carbones sp<sup>2</sup> dans les doubles liaisons C=C. La configuration *Z* ou *E* des différentes doubles liaisons a été déterminée en mesurant les constantes de couplage sachant que les valeurs sont de l'ordre de ~ 17 Hz pour la configuration *E* et d'environ 10 Hz pour la configuration *Z* (Silverstein RM & Webster FX, 1998).

De plus, les spectres RMN des acides 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque élués respectivement à 33,2 min et 33,5 min (voir **Fig. 23B**), qui ne diffèrent que par l'inversion de la configuration stéréochimique du centre chiral porté par le carbone 16, doivent présenter des différences mineures dans les déplacements chimiques et dans les constantes de couplage *J* notamment dans la région des triènes.

Sur ces bases, l'inspection des spectres RMN 1D, et en particulier de la région de résonance triène (4-7 ppm) (**Fig. 28 et la Fig. 29**) permet de distinguer rapidement parmi l'ensemble des molécules en fonction de la configuration de leur triène (par exemple différencier les composés *E,E,E* élués à 32,1 min et 32,6 min des composés *E,Z,E* élués à 33,2 min et 33,5 min (voir **Fig. 23B**)). L'assignation de résonance a été déterminée en réalisant une expérience DQF COSY et les constantes de couplage ont

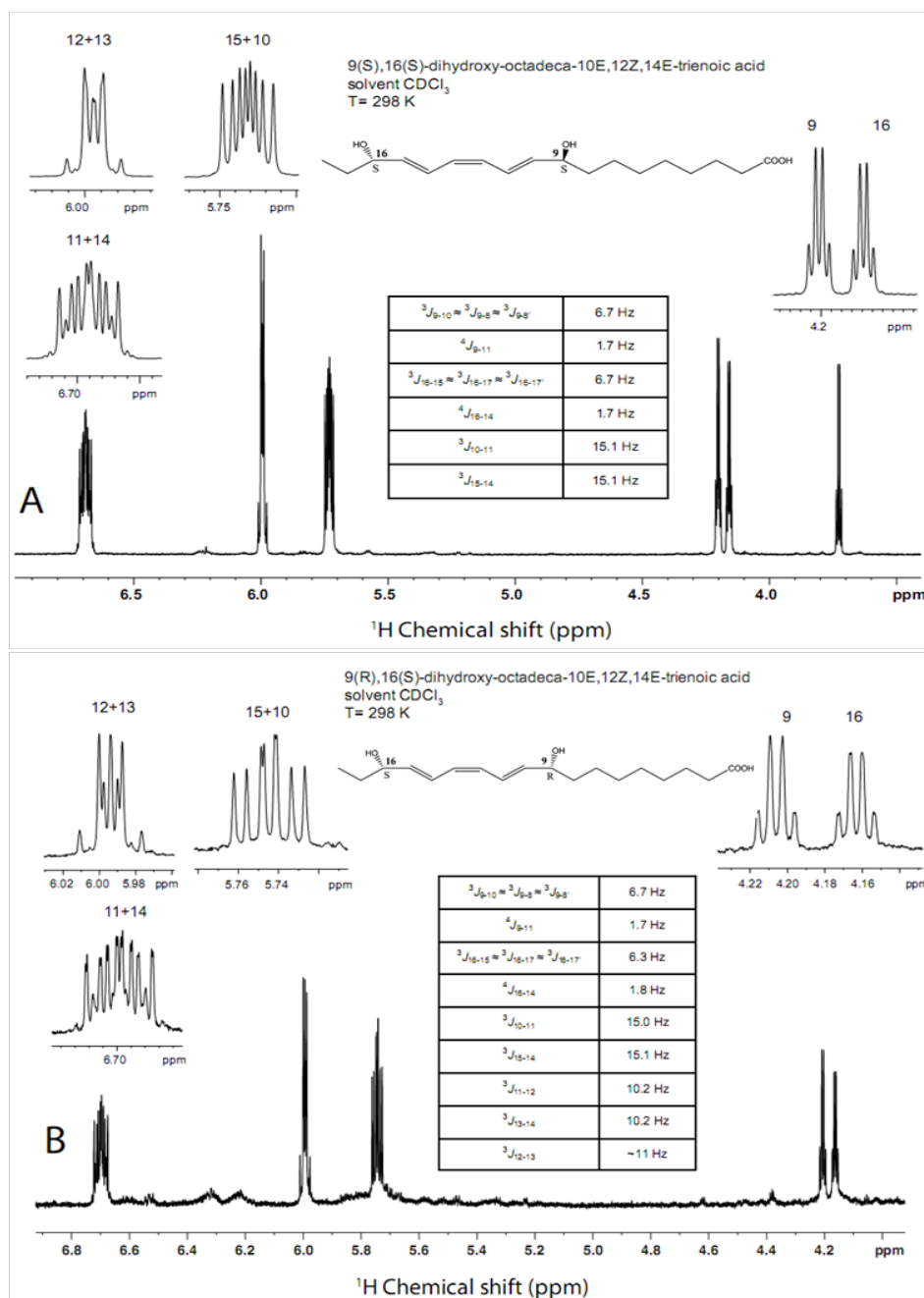
été mesurées par l'analyse des spectres 2D de résolution. De cette façon, nous avons trouvé que la constante de couplage  $J^1\text{H}-^1\text{H}-^3$  entre les protons situés des carbones 10-11 et 14-15 qui était d'environ 15 Hz dans tous les cas examinés, démontrant le caractère *E* de ces deux doubles liaisons.

La mesure de la constante de couplage  $J_{12,13}$  a été plus difficile à obtenir en raison de la *quasi*-équivalence des déplacements chimiques, des effets de second ordre entre  $\text{H}_{12}$  et  $\text{H}_{13}$  et de la superposition des signaux des carbones. Pour simplifier le modèle, nous avons observé les résonances des protons des carbones 12 et 13 dans les spectres 1D de l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque élué à 33,5 min, (**Fig. 23B**) en effectuant un découplage sélectif des protons des carbones 11 et 14. Cette importante simplification du modèle multiplet a permis de mettre en évidence un couplage  $^3J_{12-13}$  d'environ 10 Hz qui est typique d'une configuration *Z*. La même approche n'a pas pu être réalisée dans le cas des molécules *E,E,E* en raison du chevauchement fort entre les protons des carbones 11,12,13,14 qui ont des déplacements chimiques très similaires. Néanmoins, puisque la détermination de la configuration des doubles liaisons des triènes des molécules *E,Z,E* a été clairement établie ci-dessus, nous pouvons attribuer avec certitude par l'exclusion la configuration des doubles liaisons des triènes des molécules *E,E,E* sur la base des différences importante entre les spectres RMN des molécules *E,E,E* et *E,Z,E*.



**Figure 28: Techniques de RMN appliquées à l'acide 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12E,14E-triénoïque et l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12E,14E-triénoïque pour la détermination de la configuration de la double liaison**

*Spectres 1D et J-accouplements pour l'acide 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12E,14E-triénoïque (A) et l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12E,14E-triénoïque (B) l'Assignation du résonance et les constantes de couplages J ont déterminées à partir de l'analyse d'un COSY DQF et 2D des spectres de résolution (données non présentées). Les spectres ont été acquis avec 8 scans et 2s de délai de recyclage, le temps d'acquisition est de 1,8 s.*



**Figure 29: Techniques de RMN appliquées à l'acide 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque et l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque pour la détermination de la configuration de la double liaison**

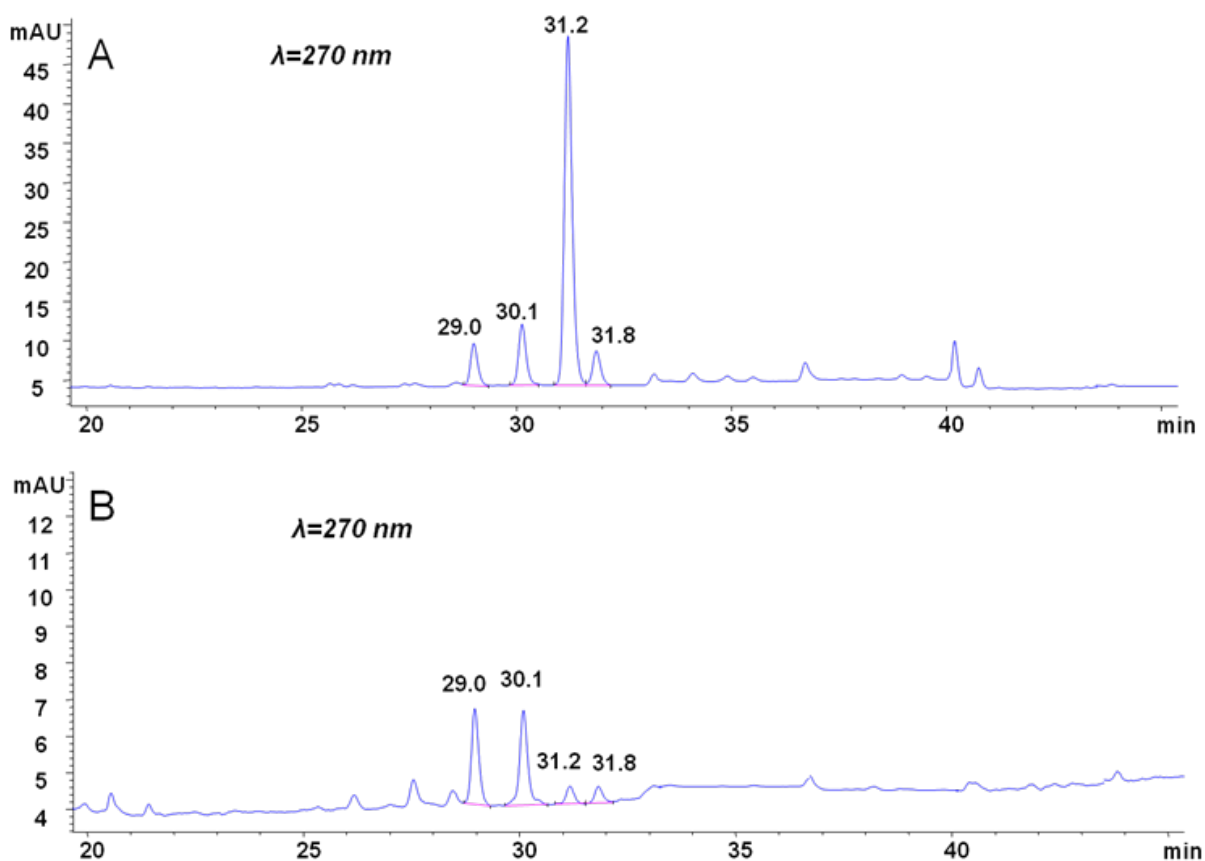
*Spectres 1D et J-accouplements pour l'acide 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque(A) et l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque (B) l'Assignation des résonances et les constantes de couplages J ont déterminées à partir de l'analyse d'un COSY DQF et spectres 2D de résolution (données non présentées). Les spectres ont acquis avec 8 scans et 2s de délai de recyclage, le temps d'acquisition est de 1,8 s.*

Cette étude RMN permet de conclure que les géométries des doubles liaisons conjuguées des di-hydroxylés sont  $10E,12E,14E$ ,  $10E,12E,14E$ ,  $10E,12Z,14E$  et  $10E,12Z,14E$  pour les différents isomères élués respectivement à 32,1 min, 32,6 min, 33,2 min et 33,5 min, voir **Fig. 23B**.

Les métabolites di-hydroxylés formés à partir de l'ALA sont les acides 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca- $10E,12E,14E$ -triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca- $10E,12E,14E$ -triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca- $10E,12Z,14E$ -triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca- $10E,12Z,14E$ -triénoïque.

### I.5 Métabolisme de l'ALA par la 15-LOX-2 recombinante humaine

Cette expérience a été réalisée afin de vérifier si la 15-LOX-2 humaine recombinante était capable de synthétiser ces métabolites. A cet effet, l'ALA, le 9(S)-HOTE et le 9( $\pm$ )-HOTE ont été incubés séparément avec cette enzyme. Nous avons trouvé que la 15-LOX-2 recombinante humaine pouvait effectivement convertir l'ALA en 13-HOTE, comme nous l'avons déjà montré précédemment avec la sLOX. Cependant, la 15-liopoxygénase recombinante humaine semble moins efficace que la sLOX pour métaboliser l'ALA en acide gras di-hydroxylés et les métabolites principaux observés (**Fig. 30B**) étaient les isomères 9,16-diHOTEs avec une configuration  $E,E,E$ , les isomères  $E,Z,E$  étant minoritaires. Par contre et sans doute plus pertinent sur le plan biologique, le dérivé mono-hydroxylé 9(S)-HOTE est très bien métabolisé en 9(S),16(S)-diHOTE (voir **Fig. 30A**). Le 9(R)-HOTE qui est produit dans des situations inflammatoires via la COX-2 via un processus de cyclisation avorté, en particulier après un traitement par l'aspirine (Schneider C & Brash AR, 2000), pourrait aussi être métabolisé en 9(R),16(S)-diHOTE par la 15-LOX-2 recombinante humaine.



**Figure 30: Exemple de chromatogrammes (HPLC) montrant les différents métabolites synthétisés à partir de 9(S)-HOTE et l'ALA via la 15-LOX humaine recombinante**

*Les conditions opératoires sont décrites au paragraphe 1.8 dans « Matériels et Méthodes ». (A) 9(S),16(S)-E,Z,E-diHOTE synthétisé à partir de 9(S)-HOTE par la 15-LOX humaine recombinante; (B) all trans-9(R),16(S)-diHOTE et 9(S),16(S)-diHOTE synthétisé à partir de l'ALA par la 15-LOX humaine recombinante.*

## I.6 Conclusion de l'étude du métabolisme oxygéné de l'ALA

Tous les résultats (chromatographiques, GC-MS, RMN) montrent que les quatre composés di-hydroxylés synthétisés à partir de l'ALA via la sLOX sont les acides 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12E,14E-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12E,14E-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque, et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque.

## II. Effet anti-agrégant et anti-inflammatoire de 9,16-diHOTES

### II.1 Effet inhibiteur des isomères 9,16-diHOTES sur la COX-1 et effets anti-agrégant

La COX-1 convertit l'acide arachidonique (20 :4n-6) en PGH<sub>2</sub> qui est ensuite transformée en prostaglandines F<sub>2α</sub>, E<sub>2</sub> et D<sub>2</sub>. Les PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub> sont des prostaglandines pro-inflammatoires.

Dans notre expérience, l'inhibition de la COX-1 de mouton par les différents isomères 9,16-diHOTES a été testée avec 1 μM des différents isomères: en mesurant à la fois de PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub> selon la méthode décrite au paragraphe VI dans « Matériels et Méthodes ».

**Tableau 1. Effet de 9,16-di-HOTES sur la COX-1 de mouton**

	contrôle	9(S),16(S)-di-HOTE <i>E,Z,E</i>	9(R),16(S)-di-HOTE <i>E,Z,E</i>
<b>COX-1</b>			
(PGD <sub>2</sub> + PGE <sub>2</sub> )	134.9 ± 15.8	96.8 ± 14.0**	83.2 ± 9.0**

*La COX-1 de mouton a été incubée séparément avec ou sans 1μM des différents isomères de 9,16-diHOTES et avec 10μM d'acide arachidonique utilisé comme substrat, respectivement. Les prostaglandines PGD<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub> ont mesurées par GC-MS après dérivatisation. Les résultats sont exprimés en ng de PGD<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub> et chaque résultat représente la moyenne ± SEM de 4 déterminations. \*\* P<0.01 vs contrôle en utilisant un test de t apparié.*

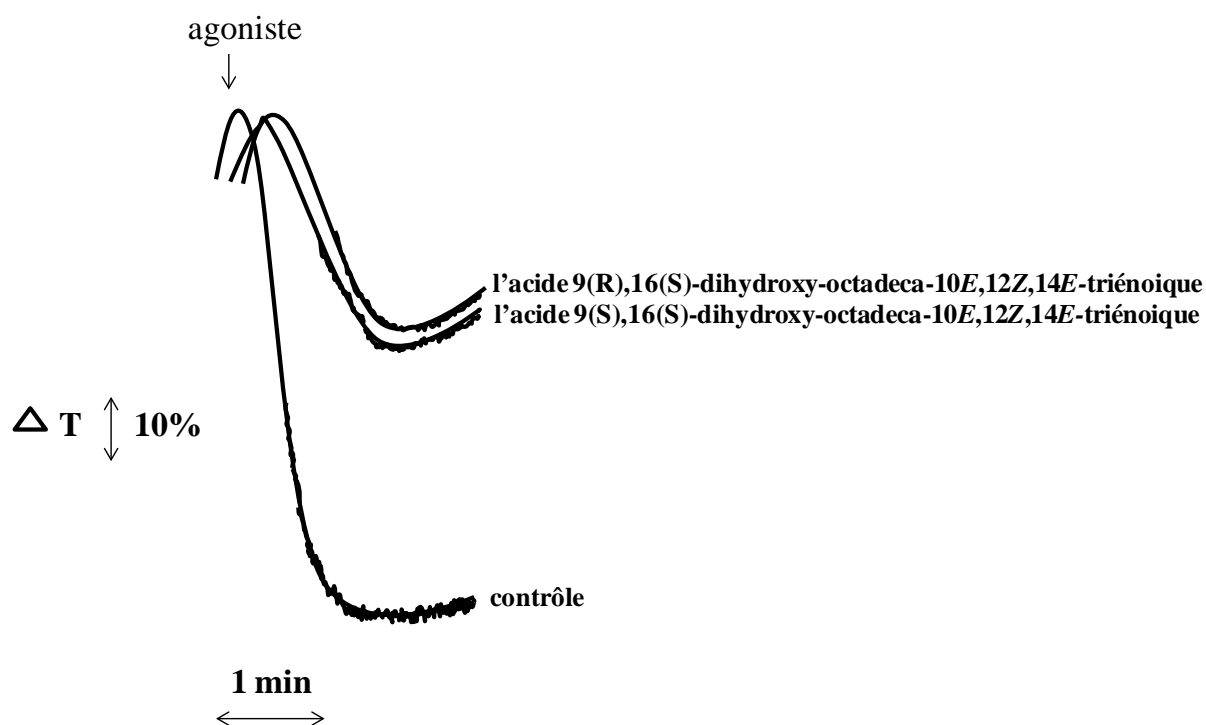
Les résultats présentés dans le Tableau 1 montrent que 1 μM de l'acide 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque diminuent significativement la synthèse des prostaglandines D<sub>2</sub> et E<sub>2</sub> respectivement d'environ 28% et 38%, et les dihydroxylés tout trans sont inactifs.

Ces métabolites di-hydroxylés issus de l'ALA semblent donc être des inhibiteurs moins puissants que la PDX qui inhibe la COX-1 de mouton d'environ 56% à 0,5  $\mu\text{M}$  et 62% à 5  $\mu\text{M}$  dans ces mêmes conditions (Liu M *et al.*, Lipids, 2013, soumis à publication).

Ces résultats sont en accord avec ceux de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.

Nous avons étudié l'effet des métabolites di-hydroxylés de l'ALA (9,16-diHOTES) sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène en absence (contrôle) ou en présence de 1  $\mu\text{M}$  des différents métabolites di-hydroxylés de l'ALA. L'agrégation des plaquettes initiée par le collagène et incubées en présence de 1  $\mu\text{M}$  des différents acides : 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque, était inhibée respectivement de 64% et 65% par rapport au contrôle (**Fig. 31**). Les isomères tout trans sont inactifs (pas d'effet sur l'agrégation plaquettaire). Ce résultat confirme des résultats antérieurs obtenus au laboratoire (Chen P *et al.*, 2011) montrant que seuls les acides gras di-hydroxylés avec des triènes *E,Z,E* étaient capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire, les dérivés tout trans étant inactifs.





**Figure 31: Effet de 9,16-diHOTEs sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène**

*Plaquettes (400  $\mu$ l) sont pré-incubées pendant 1 min à 37°C puis l'agoniste est ajouté en présence ou en absence de 1  $\mu$ M 9,16-diHOTEs. L'agrégation plaquettaire a été suivie pendant 4 min. Les profils d'agrégations sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. T : transmission.*

## II.2 Effet anti-inflammatoire des 9,16-diHOTEs

Après avoir montré que les isomères 9,16-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïques possédaient des propriétés anti-agrégantes, nous avons voulu savoir si ces composés di-hydroxylés issus de 18:3n-3 pouvaient aussi avoir des propriétés anti-inflammatoires. Pour cela, nous avons étudié l'effet des 9,16-diHOTEs sur les activités de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de la 5-LOX humaine.

## II.2.1 Effet des isomères 9,16-diHOTEs sur la COX-2 recombinante humaine

La cyclooxygénase-2 (COX-2) est impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires.

L'inhibition de la COX-2 commerciale recombinante humaine par les isomères 9,16-diHOTEs (1  $\mu$ M) a été évaluée en mesurant la synthèse des prostaglandines E<sub>2</sub> et D<sub>2</sub>. Les résultats rapportés dans le **Tableau 2** montrent que 1  $\mu$ M de l'acide 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque inhibent significativement l'activité de la COX-2 respectivement d'environ 9% et 21%.

**Tableau 2. Effet de 9,16-di-HOTEs sur la COX-2 humaine recombinante**

	contrôle	9(S),16(S)-di-HOTE <i>E,Z,E</i>	9(R),16(S)-di-HOTE <i>E,Z,E</i>
<b>COX-2</b>			
(PGD <sub>2</sub> + PGE <sub>2</sub> )	136.1 $\pm$ 11.0	124.5 $\pm$ 8.8*	107.4 $\pm$ 7.2**

*La COX-2 recombinante humaine a été incubée séparément avec ou sans 1 $\mu$ M des différents isomères de 9,16-diHOTEs et avec 10 $\mu$ M d'acide arachidonique utilisé comme substrat, respectivement. Les prostaglandines PGD<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub> sont mesurées par GC-MS après dérivation. Les résultats sont exprimés en ng de PGD<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub> et chaque résultat représente la moyenne  $\pm$  SEM de 4 déterminations. \* P<0.05, \*\* P<0.01 vs contrôle en utilisant un test de t apparié.*

## II.2.2 Effet des isomères 9,16-diHOTEs sur le métabolisme de l'acide arachidonique par la 5-LOX des leucocytes polymorphonucléaires humains

Nous avons isolé les leucocytes polymorphonucléaire (PMNs) en utilisant la méthode décrite dans paragraphe III du chapitre « Matériels et Méthodes ».

L'inhibition de la voie 5-LOX par 1  $\mu$ M des isomères 9,16-diHOTE a été évaluée en mesurant les métabolites dérivés de l'AA: 5(S)-HETE, leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>, 5(S),12(R)-Z,E,E-LTB<sub>4</sub>) et les 2 isomères tout trans du LTB<sub>4</sub> (5(S),12(R)-E,E,E-LTB<sub>4</sub> et 5(S),12(S)-E,E,E-LTB<sub>4</sub>).

Les résultats présentés dans le **Tableau 3** montrent que seul l'acide-9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque diminue significativement la formation des leucotriènes et celle du 5(S)-HETE, respectivement d'environ 10% et 20%. Ces données suggèrent que cette inhibition ne concerne que la 5-LOX et pas l'hydroxylase LTA<sub>4</sub>. Ce résultat diffère de celui obtenu pour la protectine DX (PDX) qui est inactive sur la voie de la 5-LOX, et cela même à 10  $\mu$ M (voir le **Tableau 4**). L'ensemble de ces données suggèrent que l'acide-9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque pourrait avoir un effet anti-inflammatoire.

**Tableau 3. Effet de 9,16-di-HOTEs sur la 5-LOX de leucocytes humains**

	Contrôle	9(R),16(S)-di-HOTE (E,Z,E)
<b>LTB<sub>4s</sub></b>	9.57 $\pm$ 0.66	8.78 $\pm$ 0.78*
<b>5-HETE</b>	0.89 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.05*
<b>Produits de la voie 5-LOX</b>	10.46 $\pm$ 0.68	9.49 $\pm$ 0.81*

*Les leucocytes humains isolés ont été incubés en présence ou en l'absence de 1  $\mu$ M des différents isomères de 9,16-diHOTEs à 37 ° C et avec 10  $\mu$ M d'acide arachidonique comme substrat et stimulé par 1  $\mu$ M d'ionophore A23187. Les métabolites oxygénés ont ensuite été extraits et quantifiés par RP-HPLC. Les résultats sont exprimés en nmol de la somme des métabolites synthétisés par la 5-LOX (LTB<sub>4</sub> + isomères LTB<sub>4</sub> +5-HETE). Ils représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 5 déterminations, \*  $p < 0,05$  vs contrôle en utilisant un test de *t* apparié.*

**Tableau 4. Effet de la PDX sur la 5-LOX de leucocytes humains**

	Contrôle	PDX 1 $\mu$ M	PDX 10 $\mu$ M
<b>LTB<sub>4s</sub></b>	9.0 $\pm$ 1.6	9.0 $\pm$ 3.0	9.1 $\pm$ 2.4
<b>5-HETE</b>	0.8 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.4

*Les leucocytes humains isolés ont été incubés en présence ou en l'absence de la PDX à 37°C et avec 10  $\mu$ M d'acide arachidonique comme substrat et stimulés avec 1  $\mu$ M d'ionophore A23187. Les métabolites oxygénés ont ensuite été extraits et quantifiés par RP-HPLC. Les résultats sont exprimés en nmol de la somme des métabolites synthétisés par la 5-LOX (LTB<sub>4</sub> + isomères LTB<sub>4</sub> +5-HETE). Ils représentent la moyenne  $\pm$  SD de 3 déterminations*

### **II.3 Conclusion**

En résumé, les acides 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque qui possèdent des triène avec des doubles liaisons conjuguées *E,Z,E* inhibent la voie de la COX-1 et l'agrégation plaquettaire. Seul l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque présente en plus un effet anti-inflammatoire via l'inhibition des voies COX-2 et 5-LOX.

### III. Discussion générale

L'ALA est un acide gras essentiel que l'on retrouve principalement dans les huiles végétales. Il est consommé au niveau du gramme dans l'alimentation humaine. C'est le précurseur des acides gras de la série n-3 et en particulier des acides eicosapentaénoïque (EPA) (20:5n-3) et docosahexaénoïque (DHA) (22:6n-3), cependant sa conversion en EPA et DHA est limitée puisqu'elle n'est que respectivement d'environ 10% et 1% (Brenna JT, 2002; Sinclair AJ *et al.*, 2002). Par contre, l'ALA est bien  $\beta$ -oxydé (Burdge GC, 2006; Leyton J *et al.*, 1987) ce qui explique en partie sa faible accumulation dans le plasma et les tissus.

Le voie métabolique que nous décrivons qui implique la 15-LOX que l'on retrouve dans la plupart des cellules, pourrait aussi expliquer ce taux bas d'ALA plasmatique.

Dans cette étude, nous rapportons la caractérisation complète de nouveaux métabolites dérivés de l'ALA, ainsi que leurs effets anti-inflammatoires et anti-agrégants. Nous avons montré que l'ALA était principalement converti en 13(S)-HOTE par la 15-lipoxygénase de soja (sLOX). Cependant, une petite quantité de 9(S)-HOTE a également été détectée. Ce dernier est majoritairement produit par la 15-LOX de pomme de terre (Grechkin AN *et al.*, 1991).

Il est tout d'abord intéressant de noter que contrairement aux autres acides gras polyinsaturés en C20 ou en C22 qui génèrent via un mécanisme de dioxygénation qu'un seul métabolite di-hydroxylé avec une configuration *E,Z,E*, l'ALA est converti en quatre isomères di-hydroxylés. L'existence de ces quatre produits di-hydroxylés dérivés de l'ALA avait déjà été décrite et leur structure, partiellement caractérisée par Sok et Kim (Sok DE & Kim MR, 1990; Sok DE & Kim MR, 1994). Cependant, la stéréochimie des carbones asymétriques C9 et C16 proposée par ces auteurs n'est pas compatible avec nos résultats expérimentaux. En effet l'incubation du 9(S)-HpOTE ou du 9(S)-HOTE avec la sLOX génère comme attendu un composé majoritaire identifié par GC-MS et RMN comme étant du 9(S),16(S)-diHOTE avec une configuration *E,Z,E* (**Fig. 27**). Il est synthétisé via un mécanisme de dioxygénation similaire à celui qui a déjà été mis en évidence en utilisant de l'<sup>18</sup>O dans la synthèse de la PDX (Chen P

*et al.*, 2009). Par contre le fait que le deuxième isomère avec aussi une configuration *E,Z,E* n'apparaisse uniquement que lorsque l'on incube le 9( $\pm$ )-HOTE ou l'ALA avec la 15-LOX (**Fig. 26 et 27A**) implique que les deux acides gras di-hydroxylés (*E,Z,E*) ne peuvent être que le 9(S),16(S)-diHOTE et le 9(R),16(S)-diHOTE et non le 9(S),16(S)-diHOTE et le 9(S),16(R)-diHOTE comme cela a été suggéré par Sok.

La géométrie des doubles liaisons des isomères dont les spectres UV se superposent à celui des spectres UV des isomères trans des leucotriènes a été confirmée par RMN. Cependant la stéréochimie des carbones 9 et 16 reste à démontrer en réalisant la synthèse chimique de ces molécules. Néanmoins, nous l'avons définie par comparaison avec celle déjà décrite pour les isomères 8(R),15(S)- et 8(S),15(S)-*E,E,E*-diHETE (Maas RL & Brash AR, 1983; Maas RL *et al.*, 1981) et aussi avec l'ordre d'élution des diastéréoisomères 6-trans-LTB<sub>4</sub> et 6-trans-LTB<sub>5</sub> (Lee CW *et al.*, 1982; Mencia-Huerta JM *et al.*, 1983; Lee TH *et al.*, 1984).

Nous concluons que les quatre composés di-hydroxylés issus de l'ALA traité par la sLOX sont dans l'ordre d'élution croissant: les acides 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*E*,14*E*-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*E*,14*E*-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque. Ces données suggèrent qu'il existe deux mécanismes distincts pouvant expliquer la formation de ces isomères 9,16-diHOTES. Les composés *E,Z,E*: 9(S),16(S)- et 9(R),16(S)-diHOTE résulteraient d'un mécanisme de dioxygénation comme cela a déjà été montré précédemment pour PDX (Chen P *et al.*, 2009); les isomères 9,16-diHOTES tout trans seraient formés par un autre mécanisme sans doute similaire à celui qui intervient dans la formation des isomères tout trans des leucotriènes (Shimizu T *et al.*, 1984).

Le métabolisme de l'ALA en acides gras di-hydroxylés par la sLOX est faible (3.5%) car il se forme peu de 9(S)-HOTE. L'ALA semble être un mauvais substrat pour la 15-LOX recombinante humaine qui par contre convertit efficacement le 9(S)-HOTE en 9,16-diHOTE en acides gras di-hydroxylés. Ce résultat reste cependant très intéressant d'un point de vue biologique car le 9(S)-HOTE peut être produit par les COXs comme cela a déjà été montré pour le 18:2n-6 (Kaduce TL *et al.*, 1989) et le

9(R)-HOTE par la COX-2 traitée par l'aspirine, via un processus de cyclisation avorté (Schneider C & Brash AR, 2000). Un tel mécanisme renforce le rôle anti-inflammatoire des acides 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque formés et contribuer ainsi à réduire l'inflammation.

Par ailleurs, les métabolites di-hydroxylés avec la configuration *E,Z,E* de même que les autres poxytrines sont vraisemblablement responsables pour une part des effets bénéfiques de l'ALA dans les maladies cardiovasculaires en réduisant la production des eicosanoïdes pro-inflammatoires : prostaglandine D<sub>2</sub> et E<sub>2</sub> et les leucotriènes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>,... (Ren J *et al.*, 2007; Ishihara K *et al.*, 2002; Cherian G, 2007).

La présente étude montre aussi des effets biologiques des isomères di-hydroxylés 9,16-diHOTE (*E,Z,E*) sur la COX-1. Nous avons observé que les acides 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque diminuent significativement l'activité de la COX-1. De plus, les isomères *E,Z,E* inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène. Cependant, ces métabolites dérivés de l'ALA sont, dans les mêmes conditions, moins puissants que la PDX mais valide le fait que toutes les poxytrines caractérisées par un triène conjugué *E,Z,E* sont des inhibiteurs de la COX-1 (Chen P *et al.*, 2011). La PDX inhibe à la fois la production de thromboxane A<sub>2</sub> en réponse au collagène et l'agrégation induite par l'analogue structural de la PGH<sub>2</sub> (U46619) en agissant sur le récepteur du thromboxane A<sub>2</sub> (Chen P *et al.*, 2011).

La COX-2 est une enzyme inductible qui est présente au niveau des sites d'inflammation. Elle est augmentée dans divers carcinomes et joue un rôle central dans la tumorigenèse (Aggarwal BB *et al.*, 2006). L'inhibition de la COX-2 est un mode majeur d'action visant à réduire l'inflammation (Masferrer JL *et al.*, 1994). Dans notre étude, nous avons montré que les acides 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque présentent un effet inhibiteur sur la COX-2 humaine recombinante. L'inhibition observée pour l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque devrait donc être particulièrement pertinent puisque 9(R)-HOTE peut être synthétisé au cours

de l'inflammation par la COX-2 en présence d'aspirine (Schneider C & Brash AR, 2000).

En outre, l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque diminue de façon significative la formation de leucotriènes B<sub>4</sub> et le 5(S)-HETE formés via la 5-LOX présente dans les PMN humains incubés avec de l'acide arachidonique et activés par l'ionophore calcique.

Cette inhibition apparaît stéréo sélective. Ceci suggère que l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque devrait être un agent anti-inflammatoire efficace. Le mécanisme pourrait être une compétition avec le LTB<sub>4</sub> qui possède une structure similaire : l'acide 5(S),12(R)-dihydroxy-6*Z*,8*E*,10*E*,14*Z*-eicosatétraénoïque.

En conclusion, il est intéressant de noter que les acides 9,16-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque présentent des propriétés anti-agrégantes au même titre que les autres poxytrines. En outre, l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque qui inhibe la COX-2 et la voie de la 5-LOX aurait en plus des propriétés anti-inflammatoires puisque il peut être synthétisé à partir du 9(R)-HOTE généré au cours de l'inflammation en présence d'aspirine.



# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

# CONCLUSIONS

La première partie de notre travail a permis de caractériser quatre nouveaux composés di-hydroxylés synthétisés par la sLOX à partir des acides alpha-linolénique (18:3n-3). Il s'agit des acides 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*E*,14*E*-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*E*,14*E*-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïques. L'ALA peut aussi être converti en acides gras mono-hydroxylé 13(S)-HOTE. Nous avons aussi montré que l'ALA n'est pas un très bon substrat pour la 15-LOX-2 recombinante humaine qui le transforme principalement en dérivés di-hydroxylés 9,16-diHOTE tout trans. Par contre, les isomères 9(S)- et 9(R)-HOTE qui peuvent être produits par les COXs via différents mécanismes, sont convertis efficacement en 9(S),16- et 9(R),16-diHOTEs par la 15-LOX-2 recombinante humaine. Ainsi, l'ALA pourrait jouer indirectement un rôle anti-inflammatoire.

Dans la deuxième partie, nous avons montré que seules les molécules s'apparentant aux poxytrines avec un triène conjugué *E,Z,E* inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène. Seul l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque présente un effet anti-inflammatoire via l'inhibition des voies COX-2 et 5-LOX en diminuant significativement de la formation des leucotriènes et le 5(S)-HETE.

Ces résultats éclairent un peu le rôle encore mal connu de l'ALA.

# PERSPECTIVES

Le travail effectué avec l'ALA peut être réalisé avec l'acide gamma-linolénique (18:3n-6 ou GLA). Nous avons déjà réussi à isoler 4 composés di-hydroxylés issus du GLA incubé avec la 15-lipoxygénase de soja (sLOX). Après les travaux à cellulaires, nous allons maintenant rechercher les métabolites des acides linoléiques (n-3 et n-6) dans des tissus biologiques après supplémentation puisqu'on a montré que ceux issus de l'AA pouvaient être synthétisés par la 15-LOX recombinante humaine.

Nous allons aussi étudier les effets biologiques de ces 4 isomères di-hydroxylés issus du GLA. Nous testerons leurs effets anti-agrégants sur l'agrégation des plaquettes humaines et sur la COX-1 ainsi que leurs effets anti-inflammatoires sur la COX-2 et la 5-LOX. Nous comparerons le rôle biologique des métabolites du GLA avec celui de l'ALA.

Il serait aussi intéressant de connaître le mécanisme et les intermédiaires formés au cours de la synthèse des métabolites tout trans.

Enfin, les mécanismes d'inhibition du composé 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10E,12Z,14E-triénoïque sur l'agrégation et l'inflammation reste à élucider.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adams DH & Shaw S.** Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*, **1994**, 343: 831-836.
2. **Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK & Sethi G.** Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*, **2006**, 72: 1605-1621.
3. **Alfranca A, Iñiguez MA, Fresno M & Redondo JM.** Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, **2006**, 70: 446-456.
4. **Andre E & Hou KW.** The presence of a lipid oxidase in soybean Glycine soya. *C R Acad Sci (Paris)*, **1932**, 194: 645-648.
5. **Apitz-Castro RJ, Mas MA, Cruz MR & Jain MK.** Isolation of homogeneous phospholipase A2 from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, **1979**, 91: 63-71.
6. **Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA & Serhan CN.** Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipidmediator resolvin E1. *J Exp Med*, **2005**, 201: 713-722.
7. **Arita M, Clish CB & Serhan CN.** The contributions of aspirin and microbial oxygenase in the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**, 338: 149-157.
8. **Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N & Serhan CN.** Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol*, **2007**, 178: 3912-3917.
9. **Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS & Serhan CN.** Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2005**, 102: 7671-7676.
10. **Aue WP, Karhan J & Ernst RR.** Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy. *J Chem Phys*, **1976**, 64: 4226-4227.
11. **Baer AN, Klaus MV & Green FA.** Epidermal fatty acid oxygenases are activated in non-psoriatic dermatoses. *J Invest Dermatol*, **1995**, 104: 251-255.
12. **Baggiolini M & Clark-Lewis I.** Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokines. *FEBS Lett*, **1992**, 307: 97-101.

13. **Banno Y, Nakashima S, Hachiya T & Nozawa Y.** Endogenous cleavage of phospholipase C-beta 3 by agonist-induced activation of calpain in human platelets. *J Biol Chem*, **1995**, 270: 4318-4324.
14. **Bazan NG.** Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol*, **2005**, 15: 159-166.
15. **Bazan NG.** Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J Lipid Res*, **2009**, 50 Suppl: S400-405.
16. **Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL & HLA T.** Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblast by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, **1995**, 372: 83-87.
17. **Benincasa C, De Nino A, Lombardo N & Tagarelli A.** Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern Italian regions by SPME-GC/ion trap mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, **2003**, 51: 733-741.
18. **Bild GS, Ramadoss CS, Lim S & Axelrod B.** Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **1977**, 74: 949-954.
19. **Blache D.** Structure and function of blood platelets. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, **1992**, 100: A17-24.
20. **Blanchard H, Pédrone F, Boulier-Monthéan N, Catheline D, Rioux V & Legrand P.** Comparative effects of well-balanced diets enriched in  $\alpha$ -linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2013**, 88: 383-389.
21. **Boeglin WE, Kim RB. & Brash AR.** A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci*, **1998**, 95: 6744-6799.
22. **Borngräber S, Browner M, Gillmor S, Gerth C, Anton M, Fletterick R & Kühn H.** Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. *J Biol Chem*, **1999**, 274: 37345-37350.
23. **Born GV.** Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, **1962**, 194: 927-929.
24. **Brash AR, Boeglin WE & Chang MS.** Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1997**, 94: 6148-6152.

25. **Brash AR, Ingram CD & Harris TM.** Analysis of specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids. *Biochemistry*, **1997**, 26: 5465-5471.
26. **Brash AR, Jisaka M, Boeglin WE, Chang MS, Keeney DS, Nanney LB, Kasper S, Matusik RJ, Olson SJ & Shappell SB.** Investigation of a second 15S-lipoxygenase in humans and its expression in epithelial tissues. *Adv Exp Med Biol*, **1999**, 469: 83-89.
27. **Brenna JT.** Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **2002**, 5: 127-132.
28. **Buchanan MR, Butt RW, Hirsh J, Markham BA & Nazir DJ.** Role of lipoxygenase metabolism in platelet function: effect of aspirin and salicylate. *Prostaglandins Leukot Med*, **1986**, 21: 157-168.
29. **Buchanan MR, Haas TA, Lagarde M & Guichardant M.** 13-hydroxyoctadecadienoic acid is the vessel wall chemorepellant factor, LOX. *J Biol Chem*, **1985**, 260: 16056-16059.
30. **Burdge G.** Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **2004**, 7: 137-144.
31. **Burdge GC.** Metabolism of  $\alpha$ -linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2006**, 75: 161-168.
32. **Burdge GC.** n-3 fatty acid metabolism in women-reply (letter). *Br J Nutr*, **2003**, 90: 994-995.
33. **Burdge GC & Wootton SA.** Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr*, **2002**, 88: 411-420.
34. **Butovich IA.** On the structure and synthesis of neuroprotectin D1, a novel anti-inflammatory compound of the docosahexaenoic acid family. *J Lipid Res*, **2005**, 46: 2311-2314.
35. **Butovich IA.** A one-step method of 10,17-dihydro(pero)xydocosahexa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-enoic acid synthesis by soybean lipoxygenase, *J Lipid Res*, **2006**, 47: 854-863.
36. **Calzada C, Véricel E & Lagarde M.** Low concentrations of lipid hydroperoxides prime human platelet aggregation specifically via cyclooxygenase activation. *Biochem J*, **1997**, 325: 495-500.
37. **Cassatella MA.** The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*, **1995**, 16: 21-26.

38. **Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS & Simmons DL.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**, 99: 13926-13931.
39. **Chen P, Fenet B, Michaud S, Tomczyk N, Véricel E, Lagarde M & Guichardant M.** Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. *FEBS Lett*, **2009**, 583: 3478-3484.
40. **Chen P, Véricel E, Lagarde M & Guichardant M.** Poxytins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potentially inhibit blood platelet aggregation. *FASEB J*, **2011**, 25: 382-388.
41. **Chen XS, Kurre U, Jenkins NA, Copeland NG & Funk CD.** cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases. *J Biol Chem*, **1994**, 269: 13979-13987.
42. **Cherian G.** Metabolic and cardiovascular disease in poultry: role of dietary lipids. *Poult Sci*, **2007**, 86: 1012-1016.
43. **Chiang N, Arita M & Serhan CN.** Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2005**, 73: 163-177.
44. **Chiang N, Fredman G, Bäckhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA & Serhan CN.** Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature*, **2012**, 484: 524-528.
45. **Chlopicki S, Lomnicka M & Gryglewski RJ.** Obligatory role of lipid mediators in platelet-neutrophil adhesion. *Thromb Res*, **2003**, 110: 287-292.
46. **Clària J, Dalli J, Yacoubian S, Gao F & Serhan CN.** Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat. *J Immunol*, **2012**, 189: 2597-2605.
47. **Clària J & Serhan CN.** Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1995**, 92: 9475-9479.
48. **Conquer JA, Tierney MC, Zecevic J, Bettger WJ & Fisher RH.** Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids*, **2000**, 35: 1305-1312.
49. **Croset M & Lagarde M.** Enhancement of eicosaenoic acid lipoxygenation in human platelets by 12- hydroperoxy derivative of arachidonic acid. *Lipids*, **1985**, 20: 743-750.



50. **Croset M & Lagarde M.** Stereospecific inhibition of PGH<sub>2</sub>-induced platelet aggregation by lipoxygenase products of icosanoic acids. *Biochem Biophys Res Commun*, **1983**, 112: 878-883.
51. **Cunnane SC & Anderson MJ.** The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr*, **1997**, 127: 146-152.
52. **Cunnane SC, Ryan MA, Nadeau CR, Bazinet RP, Musa-Veloso K & McCloy U.** Why is carbon from some polyunsaturates extensively recycled in lipid synthesis? *Lipids*, **2003**, 38: 477-484.
53. **Degousee N, Fazel S, Angoulvant D, Stefanski E, Pawelzik SC, Korotkova M, Arab S, Liu P, Lindsay TF, Zhuo S, Butany J, Li RK, Audoly L, Schmidt R, Angioni C, Geisslinger G, Jakobsson PJ & Rubin BB.** Microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 deletion leads to adverse left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*, **2008**, 117: 1701-1710.
54. **Demar JC Jr, Ma K, Chang L, Bell JM & Rapoport SI.** alpha-Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipids of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid. *J Neurochem*, **2005**, 94: 1063-1076.
55. **Derome AE & Williamson MP.** Rapid-pulsing artifacts in double-quantum-filtered COSY. *J Magn Res*, **1990**, 88: 177-185.
56. **Dewitt DL.** Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta*, **1991**, 1083: 121-134.
57. **Dewitt DL & Smith WL.** Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1988**, 85: 1412-1416.
58. **Dinarello CA.** Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, **1996**, 87: 2095-2147.
59. **Dona M, Fredman G, Schwab JM, Chiang N, Arita M, Goodarzi A, Cheng G, von Andrian UH & Serhan CN.** Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood*, **2008**, 112: 848-855.
60. **Doyle NA, Bhagwan SD, Meek BB, Kutkoski GJ, Steeber DA, Tedder TF & Doerschuk CM.** Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice. *J Clin Invest*, **1997**, 99: 526-533.
61. **Driscoll KE, Simpson L, Carter J, Hassenbein D & Leikauf GD.** Ozone inhalation stimulates expression of a neutrophil chemotactic protein,

- macrophage inflammatory protein 2. *Toxicol Appl Pharmacol*, **1993**, 119: 306-309.
62. **Driscoll KE**. TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett*, **2000**, 112-113: 177-183.
63. **Duffield JS, Hong S, Vaidya V, Lu Y, Fredman G, Serhan CN & Bonventre JV**. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J Immunol*, **2006**, 177: 5902-5911.
64. **Durand T, Bultel-Poncé V, Guy A, Berger S, Mueller MJ & Galano JM**. New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes. *Lipids*, **2009**, 44: 875-888.
65. **Durand T, Bultel-Poncé V, Guy A, El Fangour S, Rossi JC & Galano JM**. Isoprostanes and phytoprostanes: Bioactive lipids. *Biochimie*, **2011**, 93: 52-60.
66. **Emken EA, Adlof RO & Gulley RM**. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta*, **1994**, 1213: 277-288.
67. **Fahey TJ 3rd, Sherry B, Tracey KJ, van Deventer S, Jones WG 2nd, Minei JP, Morgello S, Shires GT & Cerami A**. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine*, **1990**, 2: 92-99.
68. **Fauconnier ML & Marlier M**. Revue bibliographique: les lipoxygénases du soja. *Biotechnol Agron Soc Environ*, **1997**, 1: 125-141.
69. **Ferguson JJ**. The role of oral antiplatelet agents in atherothrombotic disease. *Am J Cardiovasc Drugs*, **2006**, 6: 149-157.
70. **Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME & Smith MJ**. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, **1980**, 286: 264-265.
71. **Foxman EF, Kunkel EJ & Butcher EC**. Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation. *J Cell Biol*, **1999**, 147: 577-588.
72. **Fretts AM, Mozaffarian D, Siscovick DS, Heckbert SR, McKnight B, King IB, Rimm EB, Psaty BM, Sacks FM, Song X, Spiegelman D & Lemaitre RN**. Association of plasma phospholipid and dietary alpha linolenic acid with incident atrial fibrillation in older adults: the cardiovascular health study. *J Am Heart Assoc*, **2013**, 2: e003814.
73. **Frias MA, Rebsamen MC, Gerber-Wicht C & Lang U**. Prostaglandin E<sub>2</sub> activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: a role in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*, **2007**, 73: 57-65.

74. **Funk CD, Funk LB, Fitzrerald GA & Samuelsson B.** Characterization of human 12-lipoxygenase genes. *Proc Natl Acad Sci*, **1992**, 89: 3962-3966.
75. **Funk CD.** The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*, **1996**, 1304: 65-84.
76. **Funk MO, Isaac R & Porter NA.** Preparation and purification of lipid hydroperoxides from arachidonic and gamma-linolenic acids. *Lipids*, **1976**, 11: 113-117.
77. **Furse RK, Rossetti RG & Zurier RB.** Gammalinolenic acid, an unsaturated fatty acid with anti-inflammatory properties, blocks amplification of IL-1 beta production by human monocytes. *J Immunol*, **2001**, 167: 490-496.
78. **Fürstenberger G, Epp N, Eckl KM, Hennies HC, Jørgensen C, Hallenborg P, Kristiansen K & Krieg P.** Role of epidermis-type lipoxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2007**, 82: 128-134.
79. **Gan QF, Browner MF, Sloane DL & Sigal E.** Defining the arachidonic acid binding site of human 15-lipoxygenase. Molecular modeling and mutagenesis. *J Biol Chem*, **1996**, 271: 25412-25418.
80. **Garcia-Verdugo I, BenMohamed F, Tattermusch S, Leduc D, Charpigny G, Chignard M, Ollero M & Touqui L.** A role for 12R-lipoxygenase in MUC5AC expression by respiratory epithelial cells. *Eur Respir J*, **2012**, 40: 714-723.
81. **Gardner HW & Grove MJ.** Method to produce 9(S)-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids by maize lipoxygenase. *Lipids*, **2001**, 36: 529-533.
82. **Gillmor SA, Villaseñor A, Fletterick R, Sigal E & Browner MF.** The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol*, **1997**, 4: 1003-1009. Erratum in: *Nat Struct Biol*, **1998**, 5: 242.
83. **Goldstein IM, Malmsten CL, Kindahl H, Kaplan HB, Rådmark O, Samuelsson B & Weissmann G.** Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, **1978**, 148: 787-792.
84. **Golovko MY & Murphy EJ.** Uptake and metabolism of plasma-derived erucic acid by rat brain. *J Lipid Res*, **2006**, 47: 1289-1297.
85. **Golovko MY, Rosenberger TA, Feddersen S, Faergeman NJ & Murphy EJ.** Alpha-synuclein gene ablation increases docosahexaenoic acid

- incorporation and turnover in brain phospholipids. *J Neurochem*, **2007**, 101: 201-211.
86. **González-Pérez A, Planagumà A, Gronert K, Miquel R, López-Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferré N, Deulofeu R, Arroyo V, Rodés J & Clària J.** Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J*, **2006**, 20: 2537-2539.
87. **Graham-Lorence S, Truan G, Peterson JA, Falck JR, Wei S, Helvig C & Capdevila JH.** An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase. *J Biol Chem*, **1997**, 272: 1127-1135.
88. **Grechkin AN, Kuramshin RA, Safonova EY, Yefremov YJ, Latypov SK, Ilyasov AV & Tarchevsky IA.** Double hydroperoxidation of alpha-linolenic acid by potato tuber lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*, **1991**, 1081: 79-84.
89. **Grechkin A.** Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res*, **1998**, 37: 317-352.
90. **Gross S, Tilly P, Hentsch D, Vonesch JL & Fabre JE.** Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP3 receptors. *J Exp Med*, **2007**, 204: 311-320.
91. **Grossi IM, Fitzgerald LA, Umbarger LA, Nelson KK, Diglio CA, Taylor JD & Honn KV.** Bidirectional control of the membrane expression and/or activation of the tumor cell IRGpIIb/IIIa receptor and tumor cell adhesion by lipoxygenase products of arachidonic acid and linoleic acid. *Cancer Res*, **1989**, 49: 1029-1037.
92. **Guichardant M & Lagarde M.** Effects of low doses of thrombin on human platelet phospholipids. *Thromb Res*, **1980**, 18: 285-290.
93. **Gutermuth J, Bewersdorff M, Traidl-Hoffmann C, Ring J, Mueller MJ, Behrendt H & Jakob T.** Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses in vivo. *J Allergy Clin Immunol*, **2007**, 120: 293-299.
94. **Haeggström JZ.** Leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis. *J Biol Chem*, **2004**, 279: 50639-50642.

95. **Hamberg M & Samuelsson B.** Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1974**, 71: 3400-3404.
96. **Hamberg M.** Transformation of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid in human platelets. *Biochim Biophys Acta*, **1980**, 618: 389-398.
97. **Harizi H, Juzan M, Moreau JF & Gualde N.** Prostaglandins inhibit 5-lipoxygenase-activating protein expression and leukotriene B4 production from dendritic cells via an IL-10-dependent mechanism. *J Immunol*, **2003**, 170: 139-146.
98. **Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis NA, Levy BD, Serhan CN & Van Dyke TE.** 109 RvE1 protects from local inflammation and osteoclast mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J*, **2006**, 20: 401-403.
99. **Heemskerk JW, Bevers EM & Lindhout T.** Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*, **2002**, 88: 186-193.
100. **Helliwell RJ, Adams LF & Mitchell MD.** Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2004**, 70: 101-113.
101. **Helmer ME, Cook HW & Lands WEM.** Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys*, **1979**, 193: 340-345.
102. **Hendel J & Nielsen OH.** Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, **1997**, 92: 1170-1173.
103. **Herschman HR.** Function and regulation of prostaglandin synthase 2. *Adv Exp Med Biol*, **1999**, 469: 3-8.
104. **Hofmann SL & Majerus PW.** Modulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides, and calcium ions. *J Biol Chem*, **1982**, 257: 14359-14364.
105. **Hofmann SL & Majerus PW.** Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J Biol Chem*, **1983**, 258: 764-769.
106. **Holm T, Andreassen AK, Aukrust P, Andersen K, Geiran OR, Kjekshus J, Simonsen S & Gullestad L.** Omega-3 fatty acids improve blood pressure control and preserve renal function in hypertensive heart transplant recipients. *Eur Heart J*, **2001**, 22: 428-436.
107. **Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL & Serhan CN.** Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in

- murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem*, **2003**, 278: 14677-14687.
108. **Horrobin DF & Manku M.** Clinical biochemistry of essential fatty acids In: Omega-6 essential fatty acids. Pathophysiology and roles in clinical medicine. *Alan R. Liss, Horrobin DF (Ed.), New York, 1990*: 21-53.
  109. **Hsu PY, Tsai AL, Kulmacz RJ & Wang LH.** Expression, purification, and spectroscopic characterization of human thromboxane synthase. *J Biol Chem*, **1999**, 274: 762-769.
  110. **Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA & Millward DJ.** Long-chain conversion of [<sup>13</sup>C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res*, **2005**, 46: 269-280.
  111. **Imbusch R & Mueller MJ.** Formation of isoprostane F<sub>2</sub>-like compounds (phytoprostanes F<sub>1</sub>) from alpha-linolenic acid in plants. *Free Radic Biol Med*, **2000**, 28: 720-726.
  112. **Ishihara K, Komatsu W, Saito H & Shinohara K.** Comparison of the effects of dietary alpha-linolenic, stearidonic, and eicosapentaenoic acids on production of inflammatory mediators in mice. *Lipids*, **2002**, 37: 481-486.
  113. **Isobe Y, Arita M, Matsueda S, Iwamoto R, Fujihara T, Nakanishi H, Taguchi R, Masuda K, Sasaki K, Urabe D, Inoue M & Arai H.** Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E<sub>3</sub>, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. *J Biol Chem*, **2012**, 287: 10525-10534.
  114. **Italiano JE Jr & Shivdasani RA.** Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*, **2003**, 1: 1174-1182.
  115. **Jack GS, Brash AR, Olson SJ, Manning S, Coffey CS, Smith JA Jr & Shappell SB.** Reduced 15-lipoxygenase-2 immunostaining in prostate adenocarcinoma: correlation with grade and expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol*, **2000**, 31: 1146-1154.
  116. **James MJ, Gibson RA & Cleland LG.** Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*, **2000**, 71(Suppl.): 343-348.
  117. **James MJ, Penglis PS, Caughey GE, Demasi M & Cleland LG.** Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response? *Inflamm Res*, **2001**, 50: 249-253.

118. **Kaduce TL, Figard PH, Leifur R & Spector AA.** Formation of 9-hydroxyoctadecadienoic acid from linoleic acid in endothelial cells. *J Biol Chem*, **1989**, 264: 6823-6830.
119. **Kamitani H., Geller M. & Eling T.** Expression of 15-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation. *J Biol Chem*, **1998**, 273: 21569-21577.
120. **Kast RE.** Borage oil reduction of rheumatoid arthritis activity may be mediated by increased cAMP that suppresses tumor necrosis factor-alpha. *Int Immunopharmacol*, **2001**, 1: 2197-2199.
121. **Kato T, Ohta H, Tanaka K & Shibata D.** Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. *Plant Physiol*, **1992**, 98: 324-330.
122. **Kawaguchi H, Yavari R, Stover ML, Rowe DW, Raisz LG & Pilbeam CC.** Measurement of interleukin-1 stimulated constitutive prostaglandin G/H synthase (cyclooxygenase) mRNA levels in osteoblastic MC3T3-E1 cells using competitive reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Endocr Res*, **1994**, 20: 219-233.
123. **Kelavkar U, Lin Y, Landsittel D, Chandran U & Dhir R.** The yin and yang of 15-lipoxygenase-1 and delta-desaturases: dietary omega-6 linoleic acid metabolic pathway in prostate. *J Carcinog*, **2006**, 5: 9.
124. **Kinzig A, Fürstenberger G, Bürger F, Vogel S, Müller-Decker K, Mincheva A, Lichter P, Marks F & Krieg P.** Murine epidermal lipoxygenase (aloxe) encodes a 12-lipoxygenase isoform. *FEBS Lett*, **1997**, 402: 162-166.
125. **Kreft S, Ravnkar M, Mesko P, Pungercar J, Umek A, Kregar I & Strukelj B.** Jasmonic acid inducible aspartic proteinase inhibitors from potato. *Phytochemistry*, **1997**, 44: 1001-1006.
126. **Kris-Etherton PM, Harris WS & Appel LJ.** Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, **2002**, 106: 2747-2757.
127. **Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, Petasis NA & Serhan CN.** ResolvinD1 binds human phagocytes with evidence for pro-resolving receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2010**, 107, 1660-1665.
128. **Kühn H, Barnett J, Grunberger D, Baecker P, Chow J, Nguyen B, Bursztyn-Pettegrew H, Chan H & Sigal E.** Overexpression, purification and

- characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*, **1993**, 1169: 80-89.
129. **Kühn H & Borchert A.** Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med*, **2002**, 33: 154-172.
130. **Kühn H, Saam J, Eibach S, Holzhütter HG, Ivanov I & Walther M.** Structural biology of mammalian lipoxygenases: enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**, 338: 93-101.
131. **Kühn H & Thiele BJ.** The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett*, **1999**, 449: 7-11.
132. **Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW & Herschman HR.** TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, **1991**, 266: 12866-12872.
133. **Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC & Stallings WC.** Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, **1996**, 384: 644-648.
134. **Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S & Yoshioka A.** Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2002**, 22: 329-334.
135. **Kwon O, Lee E, Moon TC, Jung H, Lin CX, Nam KS, Baek SH, Min HK & Chang HW.** Expression of cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines induced by 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in human mast cells requires NF-kappa B activation. *Biol Pharm Bull*, **2002**, 25: 1165-1168.
136. **Lagarde M, Bryon PA, Guichardant M & Dechavanne M.** A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb Res*, **1980**, 17: 581-588.
137. **Lee CW, Lewis RA, Corey EJ, Barton A, Oh H, Tauber AI & Austen KF.** Oxidative inactivation of leukotriene C4 by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1982**, 79: 4166-4170.
138. **Lee TH, Mencia-Huerta JM, Shih C, Corey EJ, Lewis RA & Austen KF.** Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of



- eicosapentaenoic acid, including leukotriene B<sub>5</sub> and the double lipoxygenase product. *J Biol Chem*, **1984**, 259: 2383-2389.
139. **Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, Israel E, Haley KJ & Serhan CN.** Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. *J Immunol*, **2007**, 178: 496-502.
  140. **Lewis RA, Austen KF & Soberman RJ.** Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med*, **1990**, 323: 645-655.
  141. **Leyton J, Drury PJ & Crawford MA.** Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in rat. *Br J Nutr*, **1987**, 57: 383-393.
  142. **Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN & Bazan NG.** A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*, **2005**, 115: 2774-2783.
  143. **Maas RL & Brash AR.** Evidence for a lipoxygenase mechanism in the biosynthesis of epoxide and dihydroxy leukotrienes from 15(S)-hydroperoxyicosatetraenoic acid by human platelets and porcine leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1983**, 80: 2884-2888.
  144. **Maas RL, Brash AR & Oates JA.** A second pathway of leukotriene biosynthesis in porcine leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1981**, 78: 5523-5527.
  145. **Mack AJ, Peterman TK & Siedow JN.** Lipoxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. *Isozymes Curr Top Biol Med Res*, **1987**, 13: 127-154.
  146. **Maclouf J, de Laclos BF & Borgeat P.** Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxyicosatetraenoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1982**, 79: 6042-6046.
  147. **Majerus PW.** Arachidonate metabolism in vascular disorders. *J Clin Invest*, **1983**, 72: 1521-1525.
  148. **Marangoni F, Colombo C, De Angelis L, Gambaro V, Agostoni C, Giovannini M & Galli C.** Cigarette smoke negatively and dose-dependently affects the biosynthetic pathway of the n-3 polyunsaturated fatty acid series in human mammary epithelial cells. *Lipids*, **2004**, 39: 633-637.
  149. **Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN & Bazan NG.** Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration

- and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem*, **2003**, 278: 43807-43817.  
Erratum in: *J Biol Chem*, **2003**, 278: 51974.
150. **Marcus AJ**. Platelet function. *N Engl J Med*, **1969**, 280: 1278-1284.
151. **Marcus AJ, Ullman HL & Safier LB**. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lipid Res*, **1969**, 10: 108-114.
152. **Mariani V, Gilles S, Jakob T, Thiel M, Mueller MJ, Ring J, Behrendt H & Traidl-Hoffmann C**. Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction. *J Immunol*, **2007**, 178: 7623-7631.
153. **Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC & Seibert K**. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**, 91: 3228-3232.
154. **McMahon B, Mitchell S, Brady HR & Godson C**. Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**, 22: 391-395.
155. **Mencia-Huerta JM, Razin E, Ringel EW, Corey EJ, Hoover D, Austen KF & Lewis RA**. Immunologic and ionophore-induced generation of leukotriene B<sub>4</sub> from mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol*, **1983**, 130: 1885-1890.
156. **Menger MD & Vollmar B**. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg*, **2004**, 389: 475-484.
157. **Menten P, Wuyts A & Van Damme J**. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2002**, 13: 455-481.
158. **McCann K**. Nutrition and rheumatoid arthritis. *Explore (NY)*, **2007**, 3: 616-618.
159. **Minor W, Steczko J, Stec B, Otwinowski Z, Bolin JT, Walter R & Axelrod B**. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry*, **1996**, 35: 10687-10701.
160. **Mozaffarian D & Wu JH**. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways and clinical events. *J Am Coll Cardiol*, **2011**, 58: 2047-2067.
161. **Mueller MJ**. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant*, **1997**, 100: 653-663.
162. **Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN & Bazan NG**. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal

- pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**, 101: 8491-8496.
163. **Müller K, Siebert M, Heidt M, Marks F, Krieg P & Fürstenberger G.** Modulation of epidermal tumor development caused by targeted overexpression of epidermis-type 12S-lipoxygenase. *Cancer Res*, **2002**, 62: 4610-4616.
164. **Murphy EJ, Owada Y, Kitanaka N, Kondo H & Glatz JF.** Brain arachidonic acid incorporation is decreased in heart fatty acid binding protein gene-ablated mice. *Biochemistry*, **2005**, 44: 6350-6360.
165. **Murphy RC & Gijón MA.** Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J*, **2007**, 405: 379-395.
166. **Nagayama K, Bachmann P, Wüthrich K & Ernst RR.** The use of cross-sections and of projections in two-dimensional NMR spectroscopy. *J Magn Res*, **1978**, 31: 133-148.
167. **Nakahata N.** Thromboxane A<sub>2</sub>: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*, **2008**, 118: 18-35.
168. **Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR & Lefkowitz JB.** Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem*, **1986**, 55: 69-102.
169. **Nigam S, Zafiriou MP, Deva R, Ciccoli R & Roux-Van der Merwe R.** Structure, biochemistry and biology of hepoxilins: un update. *FEBS J*, **2007**, 274: 3503-3512.
170. **Norling LV, Dalli J, Flower RJ, Serhan CN & Perretti M.** Resolvin D1 limits polymorphonuclear leukocytes recruitment to inflammatory loci: receptor dependent actions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2012**, 32: 1970-1978.
171. **Nugteren DH.** Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochim Biophys Acta*, **1975**, 380: 299-307.
172. **O'Flaherty JT, Hu Y, Wooten RE, Horita DA, Samuel MP, Thomas MJ, Sun H & Edwards IJ.** 15-lipoxygenase metabolites of docosahexaenoic acid inhibit prostate cancer cell proliferation and survival. *PLoS One*, **2012**, 7: e45480.
173. **Ohmori M, Kuzuya T, Kodama K, Nanto S, Kamada T & Tada M.** Thromboxane A<sub>2</sub> as an enhancing factor of coronary vasospasticity in variant angina. *Jpn Circ J*, **1987**, 51: 495-502.
174. **Oh SF, Pillai PS, Recchiuti A, Yang R & Serhan CN.** Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation. *J Clin Invest*, **2011**, 121: 569-581.

175. **Okayama M, Hayashi S, Aoi Y, Nishio H, Kato S & Takeuchi K.** Aggravation by selective COX-1 and COX-2 inhibitors of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colon lesions in rats. *Dig Dis Sci*, **2007**, 52: 2095-2103.
176. **Ozeki Y, Nagamura Y, Ito H, Unemi F, Kimura Y, Igawa T, Kambayashi Ji, Takahashi Y & Yoshimoto T.** An anti-platelet agent, OPC-29030, inhibits translocation of 12-lipoxygenase and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid production in human platelets. *Br J Pharmacol*, **1999**, 128: 1699-1704.
177. **Pace-Asciak CR, Granström E & Samuelsson B.** Arachidonic acid epoxides. Isolation and structure of two hydroxy epoxide intermediates in the formation of 8,11,12- and 10,11,12-trihydroxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem*, **1983**, 258: 6835-6840.
178. **Pallast S, Arai K, Wang X, Lo EH & van Leyen K.** 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *J Neurochem*, **2009**, 111: 882-889.
179. **Parchmann S & Mueller MJ.** Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from alpha-linolenic acid in plants. *J Biol Chem*, **1998**, 273: 32650-32655.
180. **Pawlosky R, Hibbeln J, Lin Y & Salem N Jr.** n-3 fatty acid metabolism in women. *Br J Nutr*, **2003**, 90: 993-995.
181. **Piantini U, Sorensen OW & Ernst RR.** Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *J Am Chem Soc*, **1982**, 104: 6800-6801.
182. **Plante H, Picard S, Mancini J & Borgeat P.** 5-Lipoxygenase-activating protein homodimer in human neutrophils: evidence for a role in leukotriene biosynthesis. *Biochem J*, **2006**, 393: 211-218.
183. **Plourde M & Cunnane SC.** Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab*, **2007**, 32: 619-634.
184. **Poumès-Ballihaut C, Langelier B, Houlier F, Alessandri JM, Durand G, Latge C & Guesnet P.** Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat. *Lipids*, **2001**, 36: 793-800.
185. **Prigge ST, Boyington JC, Gaffney BJ & Amzel LM.** Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases. *Proteins*, **1996**, 24: 275-291.

186. **Qin Q, Patil KA, Gronert K & Sharma SC.** Neuroprotectin D1 inhibits retinal ganglion cell death following axotomy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2008**, 79: 201-207.
187. **Rådmark O, Malmsten C, Samuelsson B, Clark DA, Goto G, Marfat A & Corey EJ.** Leukotriene A: stereochemistry and enzymatic conversion to leukotriene B. *Biochem Biophys Res Commun*, **1980**, 92: 954-961.
188. **Raz A, Wyche A, Siegel N & Needleman P.** Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J Biol Chem*, **1988**, 263: 3022-3028.
189. **Recchiuti A & Serhan CN.** Pro-resolving lipid mediators (SPMs) and their actions in regulating miRNA in novel resolution circuits in inflammation. *Front Immunol*, **2012**, 3: 298.
190. **Ren J, Han EJ & Chung SH.** In vivo and in vitro anti-inflammatory activities of alpha-linolenic acid isolated from *Actinidia polygama* fruits. *Arch Pharm Res*, **2007**, 30: 708-714.
191. **Rennie KL, Hughes J, Lang R & Jebb SA.** Nutritional management of rheumatoid arthritis: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*, **2003**, 16: 97-109.
192. **Rosenberg HF & Gallin JI.** Inflammation, in *Fundamental Immunology, Fourth edition, Lippincott-Raven: Philadelphia*, **1999**, 1051-1066.
193. **Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM & Haeggström JZ.** LeukotrieneA<sub>4</sub> hydrolase/aminopeptidase. Glutamate 271 is a catalytic residue with specific roles in two distinct enzyme mechanisms. *J Biol Chem*, **2002**, 277: 1398-1404.
194. **Ruddat VC, Mogul R, Chorny I, Chen C, Perrin N, Whitman S, Kenyon V, Jacobson MP, Bernasconi CF & Holman TR.** Tryptophan 500 and Arginine 707 Define Product and Substrate Active Site Binding in Soybean Lipoxygenase-1. *Biochemistry*, **2004**, 43: 13063-13071.
195. **Scapini P, Laudanna C, Pinardi C, Allavena P, Mantovani A, Sozzani S & Cassatella MA.** Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol*, **2001**, 31: 1981-1988.
196. **Schneider C & Brash AR.** Stereospecificity of hydrogen abstraction in the conversion of arachidonic acid to 15R-HETE by aspirin-treated cyclooxygenase-2. Implications for the alignment of substrate in the active site. *J Biol Chem*, **2000**, 275: 4743-4746.

197. **Schwartzman ML, Abraham NG, Carroll MA, Levere RD & McGiff JC.** Regulation of arachidonic acid metabolism by cytochrome P-450 in rabbit kidney. *Biochem J*, **1986**, 238: 283-290.
198. **Serhan CN, Chiang N & Van Dyke TE.** Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, **2008**, 8: 349-361.
199. **Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N & Gronert K.** Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*, **2000**, 192: 1197-1204.
200. **Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Gronert K & Chiang N.** Antimicro inflammatory lipid signals generated from dietary N-3 fatty acids via cyclooxygenase-2 and transcellular processing: a novel mechanism for NSAID and N-3 PUFA herapeutic actions. *J Physiol Pharmacol*, **2000**, 51: 643-654.
201. **Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan SP & Petasis NA.** Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol*, **2006**, 176: 1848-1859.
202. **Serhan CN, Hamberg M & Samuelsson B.** Lipoxins: Novel Series of Biologically Active Compounds Formed from Arachidonic Acid in Human Leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1984**, 81: 5335-5339.
203. **Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G & Moussignac RL.** Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, **2002**, 196: 1025-1037.
204. **Serhan CN.** Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot EssentFatty Acids*, **2005**, 73: 141-162.
205. **Serhan CN.** Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators end pathways. *Annu Rev Immunol*, **2007**, 25: 101-137.
206. **Serhan CN.** Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *J Thromb Haemost*, **2009**, 7: 44-48.

207. **Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF & Spite M.** Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med*, **2009**, 206: 15-23.
208. **Shaka AJ & Freeman R.** Simplification of NMR spectra by filtration through multiple-quantum coherence. *J Magn Res*, **1983**, 51: 169-173.
209. **Shappell SB, Gupta RA, Manning S, Whitehead R, Boeglin WE, Schneider C, Case T, Price J, Jack GS, Wheeler TM, Matusik RJ, Brash AR & Dubois RN.** 15S-hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res*, **2001**, 61: 497-503.
210. **Shattil SJ.** Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost*, **1999**, 82: 318-325.
211. **Sheaff Greiner RC, Zhang Q, Goodman KJ, Giussani DA, Nathanielsz PW & Brenna JT.** Linoleate,  $\alpha$ -linolenate, and docosahexaenoate recycling into saturated and monounsaturated fatty acids is a major pathway in pregnant or lactating adults and fetal or infant rhesus monkeys. *J Lipid Res*, **1996**, 37: 2675-2686.
212. **Sheibanie AF, Khayrullina T, Safadi FF & Ganea D.** Prostaglandin E<sub>2</sub> exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. *Arthritis Rheum*, **2007**, 56: 2608-2619.
213. **Shimizu T, Rådmark O & Samuelsson B.** Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A<sub>4</sub> synthesis from arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1984**, 81: 689-693.
214. **Siebert M, Krieg P, Lehmann WD, Marks F & Fürstenberger G.** Enzymic characterization of epidermis-derived 12-lipoxygenase isoenzymes. *Biochem J*, **2001**, 355: 97-104.
215. **Siegel MI, McConnell RT & Cuatrecasas P.** Aspirin-like drugs interfere with arachidonate metabolism by inhibition of the 12-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid peroxidase activity of the lipoxygenase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1979**, 76: 3774-3778.
216. **Silverstein RM & Webster FX.** Spectrometric identification of organic compounds. 6th ed. *Wiley, New York*, **1998**, 212-213.
217. **Sinclair AJ, Attar-Bashi NM & Li D.** What is the role of  $\alpha$ -linolenic acid for mammals? *Lipids*, **2002**, 37: 1113-1123.
218. **Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T & Stenson WF.** Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **1998**, 115: 297-306.

219. **Sloane DL, Dixon RA, Craik CS & Sigal E.** Expression of cloned human 15-lipoxygenase in eukaryotic and prokaryotic systems. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, **1991**, 21A: 25-28.
220. **Smith WL, Garavito RM & DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, **1996**, 271: 33157-33160.
221. **Sok DE & Kim MR.** Conversion of alpha-linolenic acid to dihydro(pero)xyoctadecatrienoic acid isomers by soybean and potato lipoxygenases. *J Agric Food Chem*, **1994**, 42: 2703-2708.
222. **Sok DE & Kim MR.** Enzymatic formation of 9,16-dihydro(pero)xyoctadecatrienoic acid isomers from alpha-linolenic acid. *Arch Biochem Biophys*, **1990**, 277: 86-93.
223. **Sok DE, Phi TS, Jung CH, Chung YS & Kang JB.** Soybean lipoxygenase-catalyzed formation of lipoxin A and lipoxin B isomers from arachidonic acid via 5,15-dihydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, **1988**, 153: 840-847.
224. **Song C, Li X, Leonard BE & Horrobin DF.** Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1beta-induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. *J Lipid Res*, **2003**, 44: 1984-1991.
225. **Spector AA.** Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res*, **2009**, 50: S52-S56.
226. **Spector AA.** Essentiality of fatty acids. *Lipids*, **1999**, 34 Suppl: S1-S3.
227. **Spector AA, Gordon JA & Moore SA.** Hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). *Prog Lipid Res*, **1988**, 27: 271-323.
228. **Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, Flower RJ, Perretti M & Serhan CN.** Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*, **2009**, 461: 1287-1291.
229. **Sprecher H.** Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, **2000**, 1486: 219-231.
230. **Springer TA.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, **1994**, 76: 301-314.
231. **Stinson AM, Wiegand RD & Anderson RE.** Recycling of docosahexaenoic acid in rat retinas during n-3 fatty acid deficiency. *J Lipid Res*, **1991**, 32: 2009-2017.
232. **Sun D, McDonnell M, Chen XS, Lakkis MM, Li H, Isaacs SN, Elsea SH, Patel PI & Funk CD.** Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *J Biol Chem*, **1998**, 273: 33540-33547.



233. **Takahashi K, Capdevila J, Karara A, Falck JR, Jacobson HR & Badr KF.** Cytochrome P-450 arachidonate metabolites in rat kidney: characterization and hemodynamic responses. *Am J Physiol*, **1990**, 258: F781-789.
234. **Takahashi Y, Zhu H, Xu W, Murakami T, Iwasaki T, Hattori H & Yoshimoto T.** Selective uptake and efflux of cholesteryl linoleate in LDL by macrophages expressing 12/15-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**, 338: 128-135.
235. **Tobelem G.** Mechanism of platelet aggregation and mode of action of platelet antiaggregants. *Rev Prat*, **1989**, 39: 2219-2222.
236. **Vane JR, Bakhle YS & Botting RM.** Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1998**, 38: 97-120.
237. **Vang K & Ziboh VA.** 15-lipoxygenase metabolites of gamma-linolenic acid/eicosapentaenoic acid suppress growth and arachidonic acid metabolism in human prostatic adenocarcinoma cells: possible implications of dietary fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2005**, 72: 363-372.
238. **Van Os CP, Rijke-Schilder GP, Van Halbeek H, Verhagen J & Vliegthart JF.** Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1. Kinetics and regio-stereo specificities of the reaction steps. *Biochim Biophys Acta*, **1981**, 663: 177-193.
239. **Van Wees SC, Van Pelt JA, Bakker PA & Pieterse CM.** Bioassays for assessing jasmonate-dependent defenses triggered by pathogens, herbivorous insects, or beneficial rhizobacteria. *Methods Mol Biol*, **2013**, 1011: 35-49.
240. **Venkatraman JT & Chu WC.** Effects of dietary omega-3 and omega-6 lipids and vitamin E on serum cytokines, lipid mediators and anti-DNA antibodies in a mouse model for rheumatoid arthritis. *J Am Coll Nutr*, **1999**, 18: 602-613.
241. **Vick BA & Zimmerman DC.** Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol*, **1984**, 75: 458-461.
242. **Vrinten P, Wu G, Truksa M & Qiu X.** Production of polyunsaturated fatty acids in transgenic plants. *Biotechnol Genet Eng Rev*, **2007**, 24: 263-279.
243. **Feiters MC, Veldink GA & Vliegthart JFG.** Conjugated dihydroperoxyoctadecatrienoic fatty acids formed upon double dioxygenation of  $\alpha$ -linolenic acid by lipoxygenase-2 from soybeans. In *Oxidative Damage and Related Enzymes*. G. Rotilio and J. V. Bannister, editors. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, **1984**, 132-138.

244. **Wang L, Chen W, Xie X, He Y & Bai X.** Celecoxib inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic implantation tumor model of human colon cancer. *Exp Oncol*, **2008**, 30: 42-51.
245. **Watanabe T, Narumiya S, Shimizu T & Hayaishi O.** Characterization of the biosynthetic pathway of prostaglandin D<sub>2</sub> in human platelet-rich plasma. *J Biol Chem*, **1982**, 257: 14847-14853.
246. **Wecksler AT, Kenyon V, Deschamps JD & Holman TR.** Substrate specificity changes for human reticulocyte and epithelial 15-lipoxygenases reveal allosteric product regulation. *Biochemistry*, **2008**, 47: 7364-7375.
247. **Weisinger HS, Armitage JA, Sinclair AJ, Vingrys AJ, Burns PL & Weisinger RS.** Perinatal omega-3 fatty acid deficiency affects blood pressure later in life. *Nat Med*, **2001**, 7: 258-259.
248. **Werz O.** 5-Lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **2002**, 1: 23-44.
249. **Wider G, Baumann R, Nagayama K, Ernst RR & Wüthrich K.** Strong spin-spin coupling in the two-dimensional *J*-resolved 360-MHz <sup>1</sup>H NMR spectra of the common amino acids. *J Magn Res*, **1981**, 42: 73-87.
250. **Willoughby S, Holmes A & Loscalzo J.** Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs*, **2002**, 1: 273-288.
251. **Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P & Halbwachs-Mecarelli L.** Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, **2000**, 80: 617-653.
252. **Woodward DF, Liang Y & Krauss AH.** Prostamides (prostaglandin-ethanolamides) and their pharmacology. *Br J Pharmacol*, **2008**, 153: 410-419.
253. **Xiao CY, Yuhki K, Hara A, Fujino T, Kuriyama S, Yamada T, Takayama K, Takahata O, Karibe H, Taniguchi T, Narumiya S & Ushikubi F.** Prostaglandin E<sub>2</sub> protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP4. *Circulation*, **2004**, 109: 2462-2468.
254. **Yamamoto S.** Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta*, **1992**, 1128: 117-131.
255. **Yang HC, Farooqui AA & Horrocks LA.** Plasmalogen-selective phospholipase A<sub>2</sub> and its role in signal transduction. *J Lipid Mediat Cell Signal*, **1996**, 14: 9-13.
256. **Yoshimoto T & Takahashi Y.** Arachidonate 12-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2002**, 68-69: 245-262.
257. **Zurier RB.** Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*, **1976**, 2: 815-818.

## FOLIO ADMINISTRATIF

### THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

**NOM :** LIU **DATE de SOUTENANCE :** 10-07-2013

**Prénoms :** Miao

**TITRE :** Caractérisation de métabolites oxygénés issus de l'acide alpha-linoléique. Effets anti-agrégants et anti-inflammatoires

**NATURE :** Doctorat

**Numéro d'ordre :** 2013-ISAL-0059

**École doctorale :** EDISS

**Spécialité :** Biochimie

#### RESUME :

Les acides gras de la série n-3 et notamment l'acide docosahexaénoïque (DHA) jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Un de ses métabolites, la protectine DX (PDX), qui est un isomère de la protectine D1 (PD1) (Chen P *et al.*, 2009), inhibe l'agrégation des plaquettes sanguines. D'autres composés similaires appelés "poxytrins", qui possèdent aussi un triène conjugué avec une géométrie *E,Z,E*, ont également été synthétisés à partir d'autres acides gras polyinsaturés (AGPI) *via* la lipoxigénase de soja. Ces composés présentent des propriétés anti-agrégantes en inhibant la cyclo-oxygénase plaquettaire et le récepteur du thromboxane  $A_2$  (Chen P *et al.*, 2011).

Dans cette thèse, nous décrivons de nouveaux composés dihydroxylés synthétisés par la 15-lipoxygénase de soja à partir de l'acide alpha-linoléique (18:3n-3), un acide gras polyinsaturé indispensable consommé au niveau du gramme chez l'Homme adulte. Il est converti en acides gras monohydroxylés et dihydroxylés. Ces composés ont été séparés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse et caractérisés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) après dérivation adéquate. Un acide gras monohydroxylé, majoritaire, l'acide 13(S)-octadécatriénoïque (13(S)-OH-18:3) et quatre acides gras dihydroxylés ont été détectés. Ces derniers présentent tous un spectre UV caractéristique avec une absorption maximale à 270 nm et deux épaulements à 260 et 280 nm. Les spectres UV de deux d'entre eux sont superposables à celui de la PDX, ce qui suggère une géométrie *E,Z,E* des doubles liaisons de leur triène. La caractérisation complète de ces composés a été réalisée par résonance magnétique nucléaire (RMN) à haut champ et par GC-MS. Ce sont les acides 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*E*,14*E*-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*E*,14*E*-triénoïque, 9(S),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque et 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque. Ils sont également synthétisés par la 15 lipoxigénase recombinante humaine de type 2.

Ces composés dihydroxylés 9,16-diHOTES ont été testés sur les plaquettes isolées à partir du sang humain. Nous avons observé que seules les molécules ayant la géométrie *E,Z,E* du triène conjugué inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène et inhibent la cyclooxygénase-1 (COX-1) de mouton. Les propriétés anti-inflammatoires de ces produits ont également été étudiés. Tous les isomères 9,16-diHOTES, possédant un triène conjugué avec une géométrie *E,Z,E*, inhibent la cyclooxygénase-2 (COX-2) recombinante humaine et seul l'acide 9(R),16(S)-dihydroxy-octadéca-10*E*,12*Z*,14*E*-triénoïque inhibe la 5-lipoxygénase des leucocytes polymorphonucléaires (PMN), siège de la synthèse des leucotriènes issus de l'acide arachidonique.

En conclusion, les composés dihydroxylés possédant un triène conjugué *E,Z,E*, issus du 18:3n-3, ainsi que la PDX, inhibent l'activité des COX-1 et 2, et seraient anti-agrégants et anti-inflammatoires. Ces résultats donnent des perspectives pharmacologiques aux recommandations nutritionnelles promouvant la consommation d'acide alpha linoléique.

#### MOTS-CLES :

Acide octadéca-triénoïque, Acide-9,16-dihydroxy-octadéca-triénoïque, 15-lipoxygénase de soja (sLOX), Chromatographie liquide à haute performance (HPLC), Spectrométrie de masse, Résonance magnétique nucléaire (RMN), Agrégation plaquettaire, leucocytes humains

#### Laboratoire (s) de recherche :

CarMeN (Inserm U1060)/INSA-Lyon

**Directeur de thèse :** M. Guichardant

**Président de jury :** M. Lagarde

**Composition du jury :** D. Blache, M. Linder, T. Durand, E. Véricel, M. Lagarde, M. Guichardant