



HAL
open science

Mise au point, validation et application clinique d'une
technique analytique du dosage des acides
époxyeicosatriénoïques et dihydroxyeicosatriénoïques par
chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de
masse en tandem

Thomas Duflot

► To cite this version:

Thomas Duflot. Mise au point, validation et application clinique d'une technique analytique du dosage des acides époxyeicosatriénoïques et dihydroxyeicosatriénoïques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01656545

HAL Id: dumas-01656545

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01656545v1>

Submitted on 8 Dec 2017

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

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

UNIVERSITE DE ROUEN
UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2017

N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 8 Avril 2013 tient lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 20 Octobre 2017

par

Duflot Thomas

Né le 22/03/1989 à Amiens

**Mise au point, validation et application clinique d'une
technique analytique du dosage des acides
époxyeicosatriénoïques et dihydroxyeicosatriénoïques par
chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de
masse en tandem**

Directeur : Docteur Jérémy Bellien

Président du jury : Docteur Jérémy Bellien, MCU-PH

Membres du jury : Docteur Fabien Lamoureux, PH

Docteur Robinson Joannidès, PH

Docteur Najla El Gharbi-Hamza, MCU

Professeur Sylvain Dukic, PU

A Monsieur le Docteur BELLIEN,

Pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury,

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de diriger mes travaux de thèse de DES,

Pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse de Sciences,

Pour avoir porté intérêt à ce travail et accepté de le juger,

Pour la valeur de votre encadrement,

Pour m'avoir transmis votre passion de la Recherche Scientifique,

Pour votre disponibilité,

Pour votre gentillesse et votre bonne humeur,

Veillez trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur LAMOUREUX,

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,

Pour avoir accepté d'être mon co-tuteur de thèse de Sciences,

Pour la valeur de votre encadrement,

Pour m'avoir transmis votre passion pour la Pharmacogénétique et la Biologie Moléculaire,

Pour votre disponibilité,

Pour votre gentillesse et votre bonne humeur,

Veillez trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur JOANNIDES,

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,

Pour m'avoir accepté dans le Service de Pharmacologie au cours de ces 4 années,

Pour m'avoir transmis des notions sur la rigidité artérielle,

Pour votre disponibilité,

Pour votre gentillesse et votre bonne humeur,

Veillez trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur EL GHARBI-HAMZA,

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,

Pour m'avoir transmis votre passion pour la Chimie Analytique,

Pour m'avoir permis de débiter mes travaux de thèse à l'IRCOF,

Pour votre gentillesse et votre bonne humeur,

Veillez trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur DUKIC,

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,

Pour votre disponibilité,

Veillez trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

A l'ensemble des personnes ayant permis l'élaboration de cette thèse

Au Docteur IACOB

Pour avoir été présente lors des explorations des volontaires,

Pour avoir participé au recueil des données et des prélèvements,

Pour votre disponibilité,

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur RICHARD

Pour m'avoir accepté au sein de votre laboratoire de recherche,

Pour m'avoir permis de me forger une solide connaissance scientifique,

Je vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur PEREIRA

Pour m'avoir initié aux aspects techniques de la Chromatographie et de la Spectrométrie de Masse,

Pour m'avoir formé à l'utilisation des automates et au développement de la méthode,

Pour les nombreux conseils m'ayant guidé tout au long de la mise au point,

Pour ton sens de l'humour et ta bonne humeur,

Je te prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A l'ensemble des techniciens du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie

Pour m'avoir fait une place parmi vous dans la pièce des préparations,

Pour toutes les phases mobiles que vous m'avez préparées,

Pour votre gentillesse et votre sympathie,

Je vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A mes Maîtres,

Au Docteur DJERADA, pour votre aide et vos idées permettant la valorisation de ma thèse, pour votre aide, votre gentillesse et le partage de vos connaissances en Statistiques.

Au Docteur IMBERT, pour la qualité de vos remarques lors de la validation biologique des analyses de Pharmacologie-Toxicologie.

Au Professeur COSTENTIN, pour la qualité de votre enseignement et pour m'avoir donné goût à la Pharmacologie.

Au Docteur DIEU, pour m'avoir accueilli au sein de la Pharmacie Hospitalière au début de mon internat.

Au Professeur VARIN, pour m'avoir permis de poursuivre mon cursus au sein du Service de Pharmacologie dans les meilleures conditions possibles.

A mes collègues internes de Pharmacie Hospitalière, d'Innovation Pharmaceutique et Recherche et de Biologie Médicale ainsi qu'à tous ceux que j'ai côtoyés au sein du Service de Pharmacologie ou à l'Internat, et tout particulièrement au baby-foot.

A toutes les équipes médicales et paramédicales et aux secrétaires côtoyées quotidiennement durant ces années d'internat.

A mes amis, pour votre soutien et votre sens de l'humour suffisamment décalé pour pouvoir me supporter depuis ces longues années. Merci à Germinioh, Karlito, Lulu, Vinz, Gabi, Vivien et Aurélie, Vincent et Caro, Nico et Kim, Roustina et Matt, Janis et Tonito, Paulo et Annabelle, Henri et Delphine, Tyty, Elise, Alex et Anne, Cyril et Laura, Sophie et Guigui, Emilie et Matt, Kevin et aux oubliés !

A mes parents, Alain et Martine, pour avoir toujours été présents à mes côtés.

A ma sœur, Emilie, et son mari Yvon, pour mes 4 neveux et nièces adorables.

A ma belle-famille, pour votre présence et votre soutien, je vous remercie.

A Marianne, pour chaque instant passé à tes côtés, pour m'avoir supporté toutes les fois où j'ai râlé pendant l'écriture de ma thèse et surtout pour m'avoir comblé de bonheur avec la naissance de notre fils, **Titouan**, dont les innombrables sourires illuminent mes journées.

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016 - 2017
U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE (<i>détachement</i>)	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW (<i>surnombre</i>)	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire

Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologie
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (<i>surnombre</i>)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit MISSET	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François MUIR (<i>surnombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>surnombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>surnombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Virologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
-------------------------	-----	---------------

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER	Statistiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie

Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Biologie Cellulaire
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Sandrine DAHYOT	Bactériologie
----------------------------	---------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Hanane GASMI	Galénique
Mme Benedetta CORNELIO	Chimie organique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANT

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (phar)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ – Saint Julien Rouen

TABLE DES MATIERES

1	Introduction.....	28
2	Revue générale de la littérature.....	30
2.1	Les acides époxyeicosatriénoïques (EETs).....	30
2.1.1	Formation des EETs.....	30
2.1.2	Propriétés physiologiques des EETs.....	32
2.2	L'époxyde hydrolase soluble (sEH).....	36
2.2.1	Structure de l'époxyde hydrolase soluble (sEH).....	36
2.2.2	Activité enzymatique de la sEH.....	39
2.2.3	La sEH en physiologie et physiopathologie.....	42
2.2.4	Polymorphismes génétiques du gène <i>EPHX2</i>	44
2.3	Inhibiteurs pharmacologiques de la sEH.....	47
2.3.1	Les <i>trans</i> -3-phénylglycidols.....	49
2.3.2	Les chalcone-oxydes.....	49
2.3.3	Les dérivés de l'urée.....	49
2.3.4	Les benzoxazolones 4-substituées.....	52
2.3.5	Les sulfoxydes.....	52
2.4	Effets des inhibiteurs pharmacologiques de la sEH.....	53
3	Matériels et méthodes.....	56
3.1	Réactifs.....	56
3.2	Instrumentation et conditions opératoires.....	57
3.3	Préparation des solutions standards.....	60
3.4	Préparation de l'échantillon.....	60
3.5	Essais de répétabilité et de reproductibilité.....	61
3.6	Rendement d'extraction, effet de matrice et efficacité du processus.....	62

3.7	Etude de stabilité.....	63
3.8	Quantification des EETs et DHETs.....	63
3.9	Analyses statistiques.....	64
4	Résultats.....	65
4.1	Validation analytique.....	65
4.2	Quantification des EETs et DHETs plasmatiques.....	69
5	Discussion.....	76
6	Perspectives.....	81
7	Conclusion.....	86
8	Références.....	87

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux polymorphismes du gène *EPHX2* étudiés dans les maladies cardiovasculaires.

Tableau 2 : Principaux effets induits par l'administration d'un inhibiteur de l'époxyde hydrolase soluble.

Tableau 3 : Optimisation du paramétrage du spectromètre de masse.

Tableau 4 : Paramètres du spectromètre de masse pour chaque composé.

Tableau 5 : Validation de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode.

Tableau 6 : Rendement d'extraction, effet de matrice et efficacité du processus pour les EETs et les DHETs pour les échantillons dans le NaCl 0,9% et le plasma.

Tableau 7 : Pentas correspondant au ratio de l'aire sous la courbe de l'analyte sur celui de l'étalon interne pour chaque analyte préparé dans le méthanol (Groupe 1), dans le NaCl et le plasma enrichis après extraction (Groupe 2a et Groupe 2b respectivement) et avant extraction (Groupe 3a et Groupe 3b respectivement).

Tableau 8 : Tableau récapitulatif de l'étude de stabilité.

Tableau 9 : Données démographiques de la population.

Liste des figures

Figure 1 : Vue d'ensemble du métabolisme de l'acide arachidonique.

Figure 2 : Représentation schématique des différentes voies permettant d'induire la vasorelaxation par les EETs.

Figure 3 : Représentation cristallographique d'un monomère de l'époxyde hydrolase soluble.

Figure 4 : Interactions entre la triade catalytique de l'époxyde hydrolase soluble et son substrat.

Figure 5 : Pathologies faisant intervenir une dérégulation de la voie des acides lysophosphatidiques.

Figure 6 : Voies de signalisation des différents récepteurs aux acides lysophosphatidiques.

Figure 7 : Principaux inhibiteurs pharmacologiques de l'époxyde hydrolase soluble.

Figure 8 : Représentation du complexe "époxyde hydrolase soluble - N-cyclohexyl-N'-dodecylurée.

Figure 9 : Site actif de l'époxyde hydrolase soluble complexé avec le fulvestrant.

Figure 10 : Spectres de fragmentation des EETs et DHETs.

Figure 11 : Représentation du montage utilisé pour réaliser la stimulation de l'endothélium vasculaire.

Figure 12 : Chromatogramme obtenu par CLHP-SM/SM des EETs, des DHETs et des étalons internes deutérés dans le MeOH (A) et dans le NaCl 0,9% après traitement de l'échantillon (B).

Figure 13 : Représentation des chromatogrammes à la limite de quantification à 0,25 ng/mL pour les DHETs (A) et à 0,5 ng/mL pour les EETs (B).

Figure 14 : Calcul du rapport signal / bruit à la limite de quantification de chaque composé.

Figure 15 : Concentrations plasmatiques en EETs et en DHETs à l'état basal (34°C) et pendant la stimulation endothéliale induite par chauffage cutané distal (44°C) chez les sujets sains (n=14) et chez les patients atteints d'hypertension artérielle essentielle (n=5).

Figure 16 : Corrélation entre la variation d'EETs et l'augmentation du débit sanguin lors du chauffage cutané distal chez les sujets sains (n=14).

Figure 17 : Chromatogrammes représentant un échantillon plasmatique saponifié (A) et non saponifié (B).

Figure 18 : Métabolisme des acides gras époxydés.

Figure 19 : Cascades métaboliques de l'acide arachidonique (AA), de l'acide dihomo- γ -linoléique (DGLA), de l'acide linoléique, de l'acide eicosapentaénoïque (EPA), de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide γ linoléique.

Glossaire

AA : Acide aminé

AG: Acides gras

Ang-II : Angiotensine-II

ARA : Acide arachidonique

ASC : Aire sous la courbe

BK_{Ca}: Canaux potassiques calcium-dépendant de large conductance

CG : Chromatographie en phase gazeuse

CI₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CML : Cellules musculaires lisses

COX : Cyclooxygénases

C-TI : C-Terminal

CYP450 : Cytochrome P450

DCM : Dichlorométhane

DHA : Acide docosahexaénoïque

DHETs : Acides dihydroyéicosatriénoïques

EDHF : Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium

EETs : Acides époxyyéicosatriénoïques

eNOS : Monoxyde d'azote synthase endothéliale

EPA : Acide eicosapentaénoïque

GPAT : glycérophosphate acyl transférase

GR : Globules rouges

HCOOH : Acide formique

HETE : Acides hydroyéicosatétraénoïques

HMG-CoA : Hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A

HTA : Hypertension artérielle

IC : Insuffisance cardiaque

IK_{Ca} : Canaux potassiques calcium-dépendant de moyenne conductance

K_{ATP} : Canaux potassiques activés par l'ATP

kDa : Kilo Dalton

KOH : Potasse

LA : Acide linoléïque

LOX : Lipoxygénases

LPA : Acides lysophosphatidiques

LQ : Limite de quantification

mEH : Epoxyde hydrolase microsomale

NaCl : Chlorure de sodium

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NaOH : Soude

NO : Monoxyde d'azote

N-TI : N-Terminal

PL : Phospholipides

PLA : Phospholipase

PPAR : Récepteur activés par les proliférateurs de peroxyosomes

RE : Réticulum endoplasmique

sEH : Epoxyde hydrolase soluble

SK_{Ca} : Canaux potassiques calcium-dépendant de petite conductance

SM : Spectrométrie de masse

SM/SM : Spectrométrie de masse en tandem

SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide

TG : Triglycérides

1 Introduction

Les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) sont des médiateurs lipidiques synthétisés à partir de l'acide arachidonique (ARA) (20:4 ω -6) par les cytochromes P450 (CYP450) de type époxygénases, principalement au niveau de l'endothélium vasculaire (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012). Il existe 4 régioisomères d'EETs en fonction de la position de l'insaturation sur laquelle est greffé le groupement époxyde. Ces EETs possèdent de nombreuses propriétés bénéfiques sur le plan vasculaire en induisant la natriurèse et l'angiogenèse tout en prévenant l'inflammation, l'apoptose et les processus thrombotiques (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012). Une fois synthétisés, les EETs sont rapidement incorporés dans les phospholipides (PL) des membranes cellulaires par un mécanisme d'estérification dépendant de l'acyl-Coenzyme A (Klett *et al.*, 2017), constituant un pool de stockage pouvant être libéré sous l'action des phospholipases de type A (PLA₁ et PLA₂). Sous leur forme libre, les EETs sont rapidement dégradés en acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHETs), dérivés possédant une activité plus faible voire opposée aux EETs, par une enzyme appelée époxyde hydrolase soluble (sEH) (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012).

Les expérimentations animales ainsi que l'étude des polymorphismes génétiques du gène *EPHX2*, codant la sEH chez l'homme, ont permis de démontrer que la sEH pouvait être une cible pharmacologique potentielle dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Le développement et l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la sEH ayant la capacité de promouvoir les effets vasculoprotecteurs des EETs ont montré des résultats prometteurs dans des modèles murins de diabète ou d'hypertension artérielle (HTA) essentielle où le catabolisme des EETs semble accru (Bellien *et al.*,

2011; Roche *et al.*, 2015 ; Duflot *et al.*, 2014; Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2012). Ainsi, disposer d'une méthode analytique fiable et robuste de quantification des EETs et DHETs permettrait d'évaluer l'activité de la sEH (caractérisée par le ratio DHETs/EETs) dans les processus vasodilatateurs et son rôle dans les maladies cardiovasculaires. L'incorporation rapide de ces lipides dans les structures plus complexes tels que les glycérophospholipides et les lipoprotéines rend difficile leur quantification sous leur forme libre (Karara *et al.*, 1991; Karara *et al.*, 1992).

Des méthodes enzymatiques basées sur l'utilisation de PLA₂ synthétique ont démontré leur efficacité pour la libération des EETs et DHETs estérifiés en position *sn*-2 des phospholipides (Goulitquer *et al.*, 2008) mais ces composés peuvent également être situés en position *sn*-1 (Fang *et al.*, 2003). Ainsi, l'utilisation d'une méthode chimique basée sur la saponification des échantillons plasmatiques à l'aide de soude (NaOH) ou de potasse semble plus efficace et moins coûteuse pour libérer les EETs et DHETs estérifiés (Fang *et al.*, 2003; Schuchardt *et al.*, 2013). Il existe également des techniques de dosage radioimmunologiques (RIA) et immunoenzymatiques (ELISA) faciles à utiliser pour la quantification de ces composés mais ces méthodes ont l'inconvénient d'avoir une faible spécificité (risque de réactions croisées) à l'origine de faux positifs en relation avec la forte homologie de structure existante entre différents composés lipidiques proche des EETs et des DHETs (Tsikas et Zoemer, 2014). Au cours des dernières décennies, l'utilisation de la chromatographie gazeuse (CG) couplée à la spectrométrie de masse (SM) a été largement utilisée mais nécessite des étapes de dérivation pouvant s'avérer fastidieuse, coûteuse et chronophage (Goulitquer *et al.*, 2008; Tsikas et Zoemer, 2014).

Ainsi, une méthode de chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) pourrait être plus rapide et

sensible pour détecter et quantifier les EETs et DHETs mais il n'existe à l'heure actuelle ni standardisation du mode opératoire ni validation analytique des différentes méthodes utilisées précédemment. Dans ce contexte, le but de ma thèse a été de développer et de valider une technique de CLHP-SM/SM permettant la quantification simultanée des 4 régioisomères des EETs et des DHETs plasmatiques avant et après chauffage cutané distal, technique utilisée en recherche clinique pour la stimulation de la fonction endothéliale et induisant une vasodilatation de l'artère radiale (Bellien *et al.*, 2006).

2 Revue générale de la littérature

2.1 Les acides époxyeicosatriénoïques (EETs)

2.1.1 Formation des EETs

L'ARA circulant sous forme libre peut être métabolisé par les lipoxygénases (LOX), les cyclooxygénases (COX) et les CYP450, une superfamille d'hémoprotéines participant au métabolisme oxydatif des composés exogènes et endogènes (Figure 1) (Liu *et al.*, 2005). Les LOX convertissent l'ARA en acides hydroperoxyeicosatétraénoïques, forme instable rapidement transformés en acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) tandis que les COX métabolisent l'ARA en prostaglandines et thromboxanes. Les CYP450 intervenant dans le métabolisme de l'ARA peuvent être de type époxygénase (CYP1A, 2B, 2C, 2E et 2J) catalysant la formation d'EETs avec la participation du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADP) ou de type hydroxylase (CYP4A et 4F) permettant la formation de 20-HETE, puissant agent vasoconstricteur des artérioles cérébrales, rénales, mésentériques et du muscle squelettique (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012; Daikh *et al.*, 1994; Alonso-Galicia *et al.*, 1999).

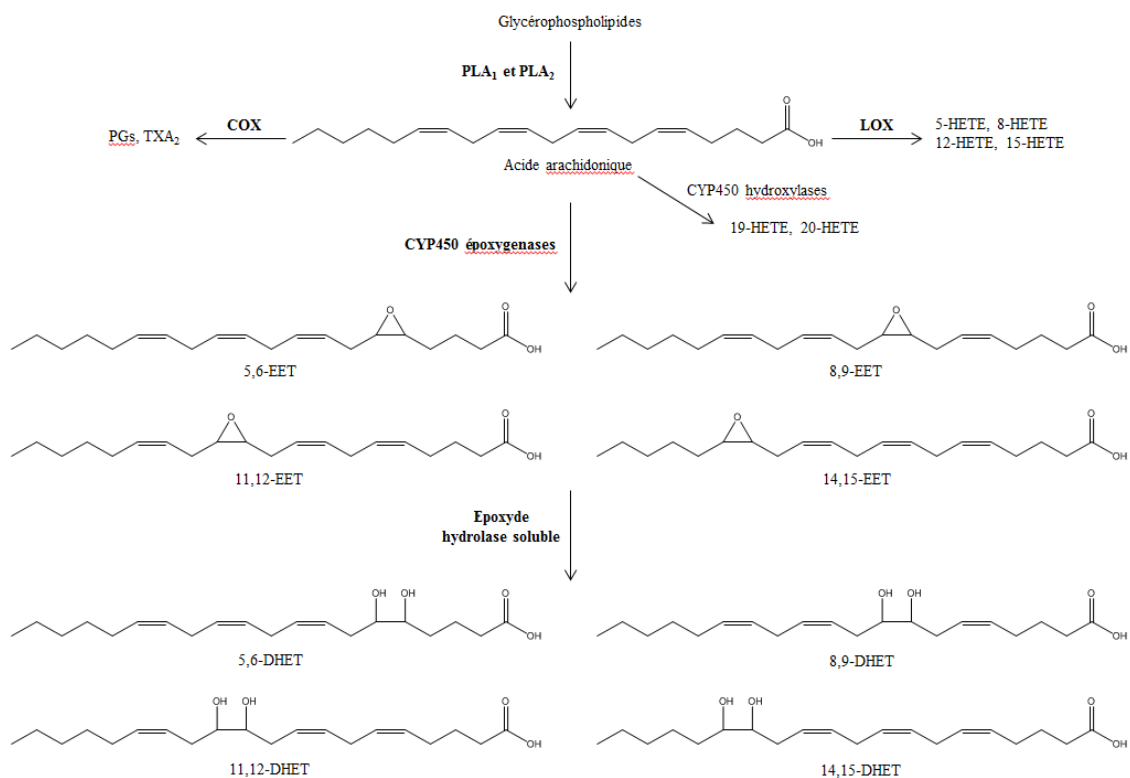


Figure 1 : Vue d'ensemble du métabolisme de l'acide arachidonique (ARA).

L'ARA peut être converti par les cyclooxygénases (COX) en prostaglandines (PGs) et thromboxanes (TxA₂) et par les lipoxygénases (LOX) en acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE). La troisième voie de métabolisation de l'ARA est réalisée par les cytochromes P450 (CYP450) de type hydroxylase (CYP4A et CYP4F) formant l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE) et de type époxygénase (CYP1A, 2B, 2C, 2E et 2J) produisant 4 régioisomères d'acides époxyeicosatriénoïques (EETs). Les EETs sont soit incorporés dans la membrane des phospholipides par un mécanisme impliquant l'acyl-Coenzyme A, constituant ainsi un pool de réserve susceptible d'être libéré grâce à l'action des phospholipase A₁ et A₂ (PLA₁ et PLA₂), soit rapidement métabolisé par l'époxyde hydrolase soluble (sEH) en dérivés diols; les acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHETs) (d'après Duflot et al., 2017).

Il a été démontré que les CYP2C et 2J sont les principaux CYP450 participant à la synthèse d'EETs dans le système cardiovasculaire (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012; Daikh *et al.*, 1994). Ces CYP450, localisés au niveau du réticulum endoplasmique (RE), catalysent le transfert d'un groupement époxyde sur

l'une des quatre insaturations de l'ARA, permettant la synthèse de 4 régioisomères d'EETs de configuration *cis*- possédant chacun 2 énantiomères *threo* : (5*R*,6*S*)-EET, (5*S*,6*R*)-EET, (8*R*,9*S*)-EET, (8*S*,9*R*)-EET, (11*R*,12*S*)-EET, (11*S*,12*R*)-EET, (14*R*,15*S*)-EET et (14*S*,15*R*)-EET, le pourcentage de chaque énantiomère dépendant de l'isoforme du CYP450 impliquée. Il existe par ailleurs des composés *trans*-EETs, présents principalement dans les globules rouges (GR), provenant de réactions radicalaires et possédant des propriétés similaires et parfois plus puissantes que les *cis*-EETs (Jiang *et al.*, 2005). Il existe une variabilité inter-espèce des différentes isoformes de CYP450 époxygénases. Ainsi, la souris exprime les CYP2C29, CYP2C38 et CYP2C44 dans les vaisseaux sanguins alors que le rat possède majoritairement les CYP2C11 et CYP2C23. Dans les artères et artérioles humaines, les principales isoformes exprimées sont les CYP2C8 et 2C9 et produisent majoritairement le 11,12-EET, considéré comme le principal facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012). D'autre part, le CYP2J2 est la principale isoforme responsable de la synthèse du 14,15-EET, plus particulièrement du 14,15(*R,S*)-EET dans le cœur, les reins, les poumons, les îlots pancréatiques et les cellules circulantes humaines.

2.1.2 Propriétés physiologiques des EETs

Les EETs sont des médiateurs lipidiques participant à de nombreuses voies de signalisation cellulaire, bien qu'aucun récepteur spécifique n'ait été clairement identifié. Ils possèdent des propriétés vasodilatatrices, anti-inflammatoires, thrombolytiques, pro-angiogéniques et anti-apoptotiques. Au sein du service de Pharmacologie du CHU de Rouen, la capacité des EETs à induire une vasodilatation des artères de conductance *in vivo* chez l'homme a été largement étudiée (Bellien *et al.*, 2006; Bellien *et al.*, 2012). En

effet, les EETs sont synthétisés dans les cellules endothéliales en réponse à la fixation d'agonistes (bradykinine, acétylcholine) sur leurs récepteurs endothéliaux ou en réponse à l'augmentation du débit sanguin et donc des forces de cisaillement s'appliquant à l'endothélium. Les 4 régioisomères d'EETs sont des EDHF responsable de la relaxation des cellules musculaires lisses (CML) vasculaires *via* différents mécanismes (Figure 2).

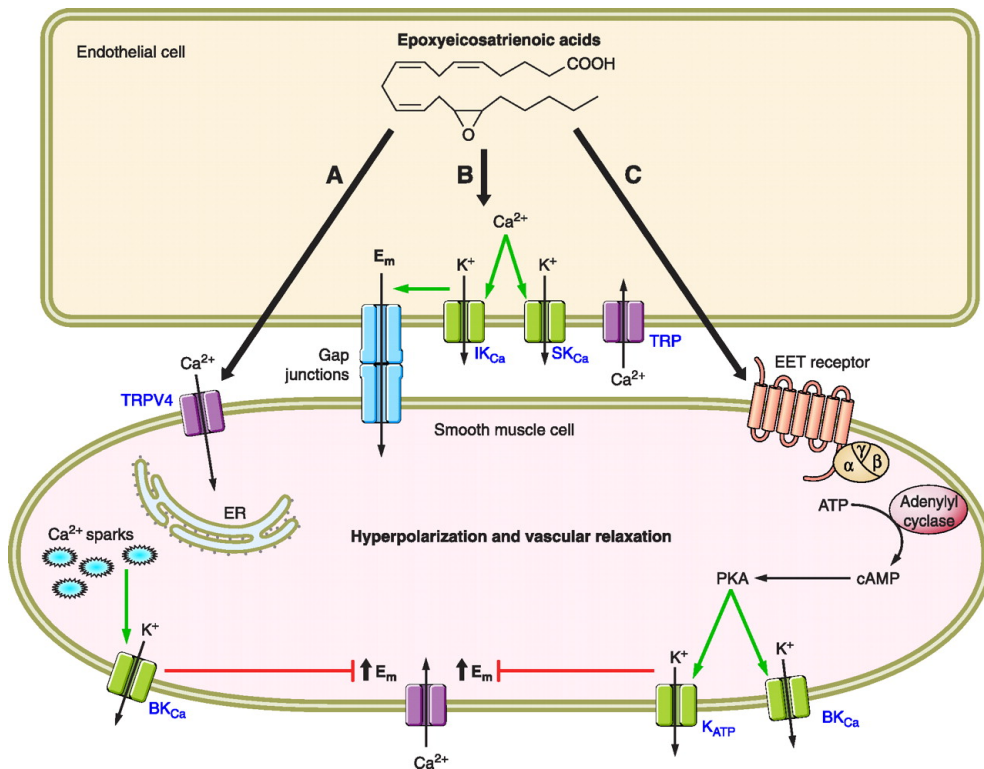


Figure 2 : Les différents mécanismes impliqués dans la vasodilatation dépendante des EETs.

A : Activation des canaux TRPV4 situés sur la CML et responsables de sparks calciques provenant du réticulum endoplasmique. Ces sparks activent les canaux potassiques calcium-dépendant de large conductance (BK_{Ca}) permettant l'hyperpolarisation de la membrane plasmique de la CML. **B :** Les EETs, en activant les canaux TRP des cellules endothéliales, permettent l'activation des canaux potassiques calcium-dépendants de petite et moyenne conductance (SK_{Ca} et I_{KCa}) induisant l'hyperpolarisation de la membrane plasmique de la cellule endothéliale. Cette hyperpolarisation est ensuite transmise à la CML via les "gap" jonctions. **C :** Les EETs se fixent un récepteur au niveau de la CML, activant une protéine kinase permettant la fuite de potassium par les BK_{Ca} et les canaux potassiques ATP dépendants (K_{ATP}) (d'après Imig et al., 2012).

La capacité des EETs à diffuser passivement à travers la membrane plasmique des cellules endothéliales leur permet d'activer les canaux potassiques calcium-dépendants de large conductance (BK_{Ca}) situés sur les CML. Ce sont également des molécules autocrines capables d'activer les canaux potassiques calcium-dépendants de petite et moyenne conductance (SK_{Ca} et IK_{Ca}) des cellules endothéliales. L'hyperpolarisation des cellules endothéliales est alors transmise aux CML par l'intermédiaire des jonctions communicantes (gap junctions) et le potassium libéré peut également activer l'ATPase Na^+/K^+ sensible à la ouabaïne participant également à l'hyperpolarisation des CML. Cette hyperpolarisation a pour finalité de réduire la probabilité que les canaux calciques voltage-dépendants, responsables de la contraction, soient en état « ouvert » induisant ainsi la relaxation de ces cellules. Il existe par ailleurs une étroite relation entre les EETs et la voie du monoxyde d'azote (NO) (Hercule *et al.*, 2009). En effet, les EET ont la capacité d'accroître l'expression et l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS) augmentant ainsi la concentration en monoxyde d'azote, principal facteur vasodilatateur provenant de l'endothélium. Le NO libéré va à son tour réduire l'activité des CYP2C et donc la synthèse d'EETs (Bellien *et al.*, 2011). Ainsi, la baisse du NO en pathologie entraîne une augmentation de l'activité des CYP450 et une libération compensatrice des EETs, permettant de maintenir une réponse vasodilatatrice à certains stimuli (Bellien *et al.*, 2011). Paradoxalement, les propriétés des EETs au niveau pulmonaire sont complètement opposées à celles de la circulation systémique. Ainsi, les EETs induisent sur les vaisseaux pulmonaires une action vasoconstrictrice directe par l'intermédiaire des canaux TRPC6 (Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6) (Loot et Fleming, 2011).

Une autre propriété intéressante des EETs sur le plan vasculaire est sa capacité à diminuer les processus inflammatoires. En effet, les EETs réduisent l'expression des

molécules d'adhésion aux cellules vasculaires (VCAM-1) et l'adhésion des leucocytes au lit vasculaire en réponse aux stimuli inflammatoires par l'intermédiaire de l'inhibition de la kinase I κ B puis du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) et (Node *et al.*, 1999). Les effets anti-inflammatoires des EETs sont également transmis par les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) et la diminution de l'expression de la COX-2 inducible (Bellien *et al.*, 2011). Par ailleurs, le 11,12-EET est le seul régioisomère possédant des propriétés anti-migratoires et antiprolifératives sur des CML mises en culture par un mécanisme faisant intervenir l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et la protéine kinase A (PKA) (Liu *et al.*, 2005, Sun *et al.*, 2002).

D'autre part, les EETs sont connus pour être impliqués dans l'angiogenèse en agissant sur la voie de signalisation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Webler *et al.*, 2008). De plus, les 5,6- et 8,9-EETs contribuent à la migration des cellules endothéliales en induisant la dégradation de la matrice extracellulaire, un pré-requis nécessaire au processus angiogénique. Les autres voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'angiogenèse et faisant intervenir les EETs incluent l'activation de la eNOS, des protéines kinases activées par la mitose (MAPK) et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Bellien *et al.*, 2011). Concernant la régulation de l'hémostase, les *trans*-EETs stockés dans les GR peuvent être libérés sous l'action de la PLA₂ et participer à la vasodilatation, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et aux processus de résolution de l'inflammation (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012).

De plus, les EETs ont également la capacité d'accroître l'expression et la libération de certaines enzymes fibrinolytiques dans les cellules endothéliales humaines, telle que l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) (Node *et al.*, 2001; Giannarelli *et al.*, 2009). Concernant la régulation de la fonction cardiaque, le rôle des EET n'a pas

été clairement élucidé, bien que leur rôle bénéfique dans la prévention des lésions d'ischémie-reperfusion soit indiscutable. En effet, ils ne semblent pas altérer la contractilité cardiaque dans des modèles d'animaux sains bien que régulant l'activité des canaux ioniques présents sur la membrane des cardiomyocytes (Moffat *et al.*, 1993). Plus précisément, les EETs permettent l'ouverture des canaux sodiques et des canaux potassiques dépendant de l'ATP (K_{ATP}) dans les cardiomyocytes murins (Xiao, 2007). Parallèlement à leurs effets cardiovasculaires, ils semblent jouer un rôle important sur le plan métabolique. Dans les cellules pancréatiques, le 5,6-EET semble promouvoir la libération d'insuline tandis que les 8,9- 11,12- et 14,15-EET permettent la libération de glucagon (Falck *et al.*, 1983). Ils peuvent également moduler la sensibilité à l'insuline en diminuant la phosphorylation de la kinase c-Jun et en promouvant la phosphorylation du récepteur à l'insuline au niveau des hépatocytes (Skepner *et al.*, 2011). La modulation de l'activité des PPAR par les EETs semble également participer à la régulation de la lipogénèse par la surexpression de certaines protéines impliquées dans le transport et le métabolisme des acides gras (AG) ou des triglycérides (TG) (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012).

2.2 L'époxyde hydrolase soluble (sEH)

2.2.1 Structure de l'époxyde hydrolase soluble (sEH)

La sEH appartient avec l'époxyde hydrolase microsomale (mEH) à une catégorie d'enzyme appelée α/β hydrolase. La transcription et la traduction des gènes *EPHX1* et *EPHX2* résultent respectivement en la synthèse de la mEH et de la sEH (Morisseau et Hammock, 2013). *EPHX2*, qui a été cloné et caractérisé pour la première fois en 1993 (Beetham *et al.*, 1993), est un gène de 60 kilobases incluant 19 exons composés de 27 à 265 paires de bases et encodant une protéine de 555 acides aminés (AA) (Beetham *et*

al., 1993). Chez l'homme, le gène *EPHX2* est localisé sur la région chromosomique 8p21-q12. Chez les mammifères, la sEH est une enzyme homodimérique ubiquitaire consistant en deux monomères de 62 kilos Daltons (kDa) chacun et arrangés de manière antiparallèle (Decker *et al.*, 2009). La sEH est principalement localisée dans le cytosol et les peroxysomes des cellules et possède 2 activités enzymatiques situées sur 2 domaines structuraux distincts (Beetham *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 2004; Bernstein *et al.*, 1977) (Figure 3).

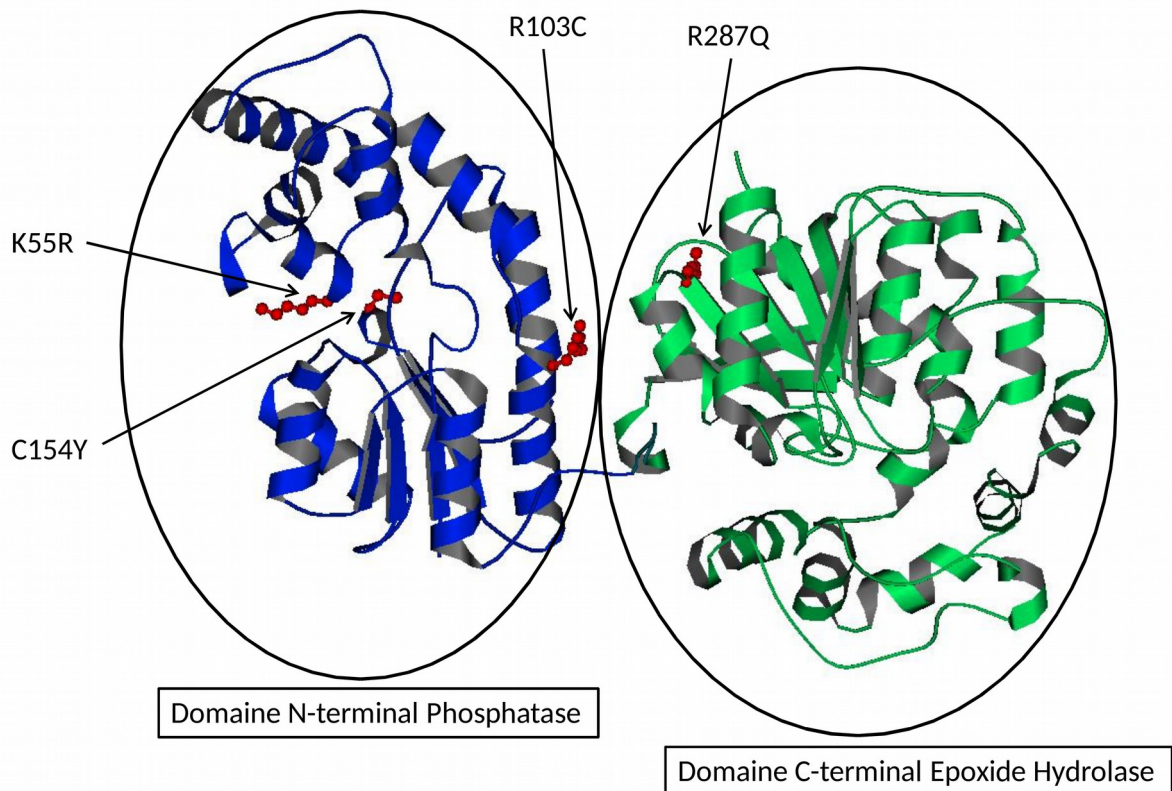


Figure 3 : Représentation cristallographique d'un monomère de l'époxyde hydrolase soluble (sEH). Les principaux polymorphismes génétiques (SNP) ayant un impact clinique sont représentés en rouge (d'après Duflot *et al.*, 2014). Image modifiée à partir de RCSB PDB (www.rcsb.com) du PDB ID 1S8O (Gomez *et al.*, 2004).

L'activité époxyde hydrolase de la sEH humaine est localisée sur le domaine C-Terminal (C-TI) de 35 kDa (de l'AA 235 à 555) et possède une forte homologie avec

une enzyme bactérienne appelée haloalkane déhalogénase. L'activité phosphatase de la sEH est quant à elle située sur le domaine N-Terminal (N-TI) de 25 kDa (de l'AA 1 à 224) et est similaire à celle de l'haloacide déhalogénase. Ces deux domaines sont reliés par un peptide de dix AA riche en proline (Gomez *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2004; Newman *et al.*, 2003; Cronin *et al.*, 2003). Sous sa forme dimérique, la partie hydrolase d'un monomère de la sEH est relié à la partie phosphatase du deuxième monomère et l'arginine située en position 287 joue un rôle prépondérant dans la structure quaternaire de la protéine (Srivastava *et al.*, 2004). En effet, il existe une liaison ionique intermonomérique entre Glu254 et Arg287 indispensable à la dimérisation et à l'activité de la sEH (Nelson *et al.*, 2013). Asp333, His523 et Asp495 forment la triade catalytique de l'enzyme nécessaire à l'activité hydrolase de la sEH (Figure 4) (Arand *et al.*, 1996). L'activité de la sEH est prépondérante dans le foie, puis dans le rein et à un moindre degré dans les autres tissus extra-hépatiques.

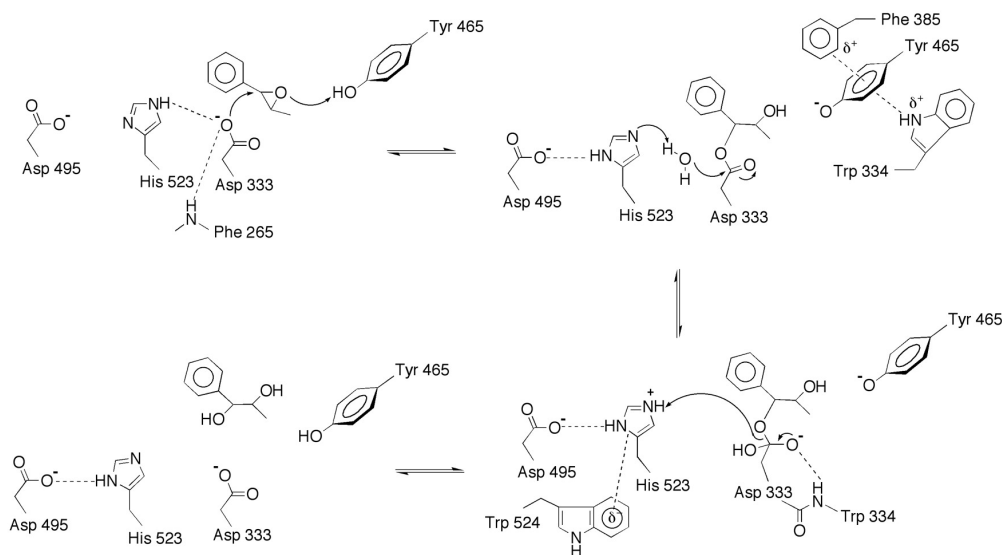


Figure 4 : Interactions clés entre la triade catalytique de la sEH et un substrat époxydé (*trans-β-methylstyrene oxide*), permettant son hydrolyse en diol (d'après Arand *et al.*, 1996).

2.2.2 Activité enzymatique de la sEH

Les α/β hydrolases sont une famille d'enzyme catalysant la conversion des groupements époxydes en diols. Alors que la mEH est une enzyme clé de la détoxification de certains contaminants environnementaux, la sEH est la principale enzyme intervenant dans le métabolisme des EETs, les *cis*-époxydes mono- et di-substitués étant ses substrats préférentiels (Decker *et al.*, 2009). Cependant, ces composés peuvent également suivre différentes voies métaboliques tels que la beta-oxydation, l'élongation de la chaîne hydrocarbonée ou encore le métabolisme par les COX (pour le 5,6-EET uniquement). Après action de la sEH, chaque régioisomère d'EET synthétisé à partir de l'époxydation de l'ARA est converti en DHET sous forme de 2 énantiomères *érythro* (*R,R* ou *S,S*) (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012). L'activité hydrolase de la sEH n'est pas exclusivement limitée aux dérivés de l'ARA et de nombreux lipides époxydés intervenant dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire sont également des substrats de la sEH. Parmi eux, on distingue particulièrement les dérivés de l'acide linoléique (LA) convertis en dérivés pro-inflammatoires, les acides dihydroxyoctadécénoïques, dont l'inhibition de la synthèse pourrait contribuer aux effets bénéfiques des inhibiteurs de la sEH. De plus, les AG époxydés appartenant à la famille des ω -3 (dérivés de l'acide docosahexaénoïque ou DHA et de l'acide eicosapentaénoïque ou EPA), formés par l'action des CYP époxygénases, sont également des substrats de la sEH (Morisseau et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012; Ulu *et al.*, 2013; Morisseau *et al.*, 2010). La conversion des EETs en DHETs est régiosélective et la vitesse d'hydrolyse du groupement époxyde est plus faible lorsqu'on se rapproche du groupement carboxylique de l'AG. Ainsi, le 14,15-EET est le substrat préférentiel de la sEH avec le K_m le plus faible et la V_{max} la plus élevée, suivi du 11,12-EET, du 8,9-EET et enfin du 5,6-EET (Morisseau et

Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2011; Imig, 2012; Ulu *et al.*, 2013; Morisseau *et al.*, 2010). Il a été démontré que la sEH hydrolyse préférentiellement les dérivés *trans*- par rapport aux dérivés *cis*- et que les lipides époxydés en ω -3 sont de meilleurs substrats que les ω -6 (Morisseau *et al.*, 2010).

La fonction phosphatase de la sEH a été caractérisée près de 30 ans après la fonction hydrolase et son rôle biologique n'a toujours pas été élucidé. Des études *in vitro* suggèrent que la partie phosphatase pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité de la eNOS (Newman *et al.*, 2003; Cronin *et al.*, 2003) et dans le métabolisme de précurseurs pyrophosphates du cholestérol tels que le géranylgeranyl pyrophosphate, le géranyl pyrophosphate et le farnesyl pyrophosphate, ainsi que de certains dérivés des PL, les acides lysophosphatidiques (LPA) (Enayetallah *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2005; Morisseau *et al.*, 2012).

Les LPA sont impliqués dans différentes voies de signalisation par le biais de récepteurs couplés à une protéine G, suggérant leur participation dans différents processus physiopathologiques (Figure 5) (Lin *et al.*, 2010). Ils proviennent de l'action des PLA₁ et PLA₂ sur les PL, de l'action de l'autotaxine et de la lysophospholipase D sur les lysoPL, de l'acylation du glycérol-3-phosphate par la glycerophosphate acyl-transférase ou encore de la phosphorylation des monoacylglycérols par la monoacylglycérol kinase (Lin *et al.*, 2010). Il existe une grande variété de LPA en fonction de la nature des AG et de la position du carbone sur lequel ils sont estérifiés sur le « squelette carboné » du glycérol. Cette particularité permet aux LPA de posséder une affinité plus ou moins grande sur les différents sous-types de récepteurs qu'ils peuvent activer (Fig. 6) (d'après Lin *et al.*, 2010 et Yung *et al.*, 2014). Sur le plan vasculaire, les LPA sont des facteurs d'activation plaquettaire et peuvent induire un remodelage

vasculaire qui pourrait favoriser la survenue d'évènements thrombotiques et athéromateux (Smyth *et al.*, 2008).

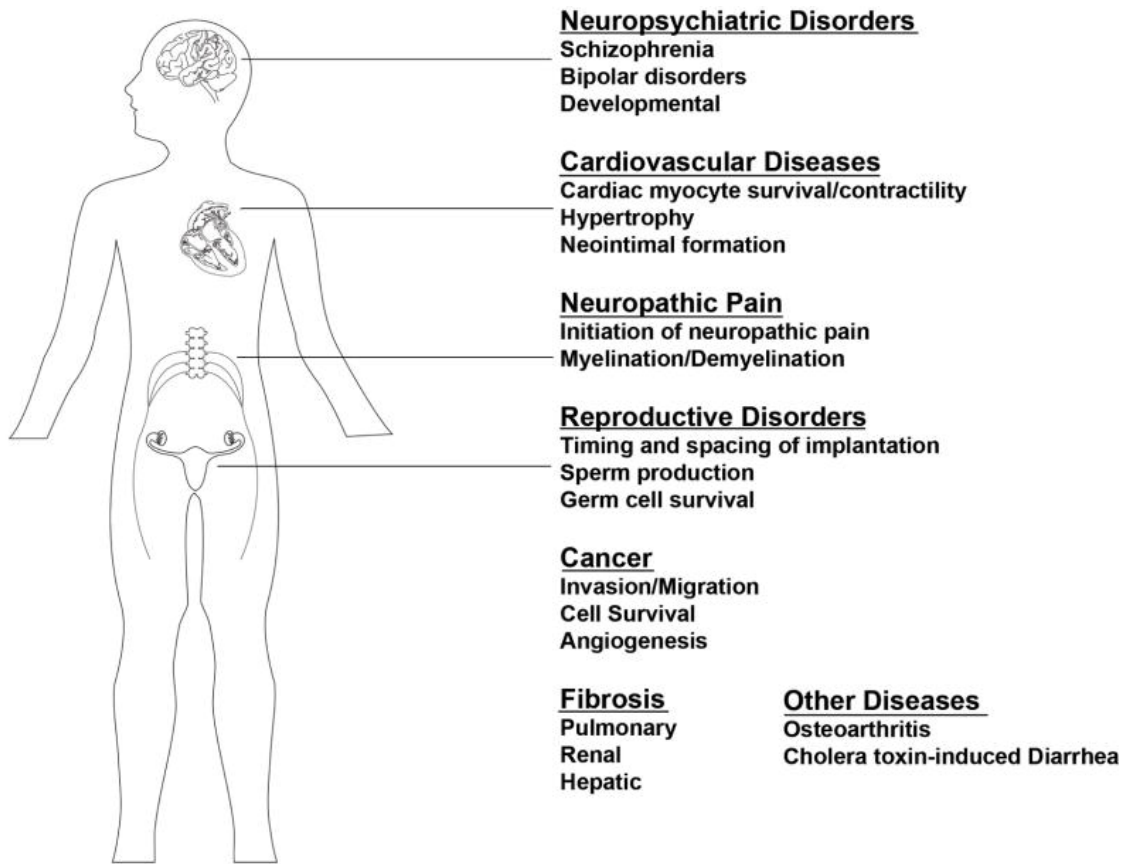


Figure 5 : Maladies impliquant une dérégulation de la voie des LPA (d'après Lin *et al.*, 2010)

L'utilisation d'agents pharmacologiques inhibant la synthèse des LPA ou bloquant certains de ses récepteurs ont ainsi permis de diminuer l'inflammation et la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Gierse *et al.*, 2010; Swaney *et al.*, 2010). La partie phosphatase de la sEH, en permettant la dégradation des LPA, pourrait ainsi jouer un rôle protecteur sur le plan cardiovasculaire et en particulier au niveau pulmonaire. En effet, des souris *knock-out* pour la sEH, donc sans activité hydrolase ni phosphatase, ont une augmentation du remodelage pulmonaire en réponse à une hypoxie chronique alors que la simple inhibition pharmacologique de la partie hydrolase n'a pas d'impact (Keserü *et al.*, 2010).

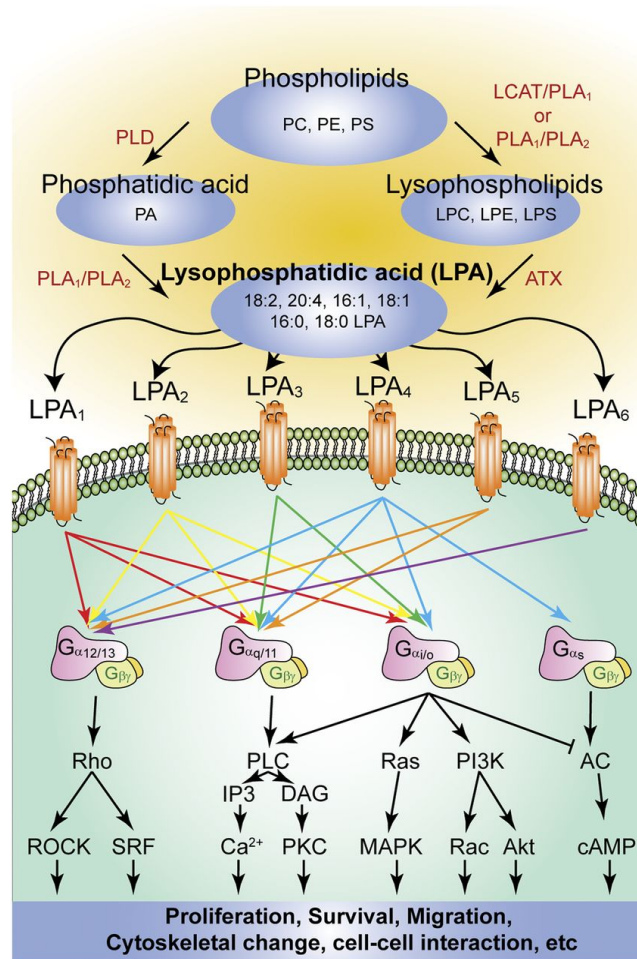


Figure 6 : Les différentes voies de synthèse et de signalisation des LPA (d'après Yung *et al.*, 2014)

2.2.3 La sEH en physiologie et physiopathologie

De nombreuses fonctions biologiques semblent être régulées par la sEH. Tout d'abord, la sEH joue un rôle majeur dans le contrôle du tonus vasculaire, plus précisément dans la régulation du débit sanguin et de la pression artérielle, grâce à sa capacité à hydrolyser les dérivés époxydés du LA et de l'ARA. En effet, l'augmentation de la disponibilité des EETs dans une lignée de souris *knock-out* pour le gène *EPHX2* codant la sEH est associée à une diminution de la pression artérielle (PA) (Sinal *et al.*, 2000). Cependant, cette diminution de la PA n'a été détectée que chez les souris mâles, suggérant un rôle des œstrogènes dans la diminution de l'expression et de l'activité de la

sEH (Zhang *et al.*, 2009). Par ailleurs, certaines données expérimentales ont permis d'affirmer que dans certains modèles murins d'HTA (rats spontanément hypertendus et HTA induite par l'angiotensine-II ou Ang-II), l'expression de la sEH était augmentée, contribuant ainsi à une hydrolyse plus importante des EETs en DHETs au niveau vasculaire et rénal (Yu *et al.*, 2000; Imig *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2011). Sur le plan mécanistique, l'Ang-II est capable d'augmenter l'expression et la quantité circulante de sEH en suractivant le promoteur du gène *EPHX2* par la fixation sur les sites AP-1 de c-Jun et c-Fos, via l'action de l'Ang-II sur son récepteur AT₁ (Ai *et al.*, 2007). En accord avec ces données, les patients présentant une HTA rénovasculaire ont un ratio DHETs/EETs augmenté, suggérant une plus forte activité de la sEH (Minuz *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'altération de la dilatation endothélium-dépendante en réponse à l'augmentation du débit sanguin au niveau des artères de conductance chez les patients présentant une HTA essentielle est notamment due à une diminution de la disponibilité des EETs (Bellien *et al.*, 2012). La sEH pourrait également jouer un rôle dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque (IC) puisque l'augmentation de l'activité de la sEH induite par l'Ang-II est également observée au niveau cardiaque, contribuant au remodelage ventriculaire par la suppression de l'effet anti-hypertrophique des EETs et par inhibition du facteur nucléaire κ B (NF- κ B). De plus, une altération de la voie des EETs dans le développement de l'IC sans HTA a également été observée sur une lignée de rats spécifiquement sélectionnée pour son taux élevé de sEH circulante (Monti *et al.*, 2008). La sEH intervient également dans le métabolisme du glucose et des lipides et favorise l'insulino-résistance (Roche *et al.*, 2015; De Taiye *et al.*, 2010). La sEH semble aussi être impliquée dans le métabolisme du cholestérol avec une diminution de sa concentration plasmatique de l'ordre de 25% chez les souris *knock-out* comparées aux souris sauvages. Ainsi, une surexpression de la sEH dans un contexte

physiopathologique pourrait favoriser le développement de l'athérosclérose en dérégulant le métabolisme du cholestérol et le ratio entre les lipides époxydés anti-inflammatoires et leurs dérivés diols pro-inflammatoires. Curieusement, les deux activités (hydrolase et phosphatase) de la sEH semblent jouer un rôle dans la régulation du cholestérol (EnayetAllah *et al.*, 2008). En effet, lorsque la partie phosphatase est inactivée (mutation sur le site catalytique de la phosphatase), le cholestérol total diminue, tandis qu'une inactivation de la partie hydrolase entraîne une augmentation de 40% des concentrations en cholestérol dans des modèles de cultures cellulaires (cellules HepG2) (EnayetAllah *et al.*, 2008). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que la partie hydrolase de la sEH diminue l'expression de l'hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A réductase (HMG-CoA), enzyme limitante de la synthèse du cholestérol, alors que la partie phosphatase permet la surexpression de cette enzyme par la régulation de certains facteurs nucléaires (PPAR- α et Liver X Receptor) contrôlant la biosynthèse du cholestérol (EnayetAllah *et al.*, 2008). Enfin, la sEH possède d'autres fonctions moins étudiées incluant la régulation du flux sanguin cérébral, la libération des neurotransmetteurs (Sura *et al.*, 2008), la fertilité (Luria *et al.*, 2009) ou encore le tonus vasculaire au niveau pulmonaire (Keserü *et al.*, 2010).

2.2.4 Polymorphismes génétiques du gène *EPHX2*

L'hypothèse selon laquelle des facteurs génétiques seraient susceptibles d'altérer l'activité de la sEH a été émise au début des années 1990. En effet, le gène *EPHX2* est hautement polymorphique avec plus de 100 mutations génétiques (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP) décrites. Certains de ces SNP sont dits non-synonymes car ils induisent une variation de la séquence en AA de la protéine responsable d'une modification de son activité (Srivastava *et al.*, 2004; Enayetallah *et al.*, 2006; Zordoky

et al., 2010; Przybyla-Zawislak *et al.*, 2003). Les SNP non-synonymes Lys55Arg (rs41507953), Cys154Tyr (rs57699806), Arg287Gln (rs751141) et le double mutant Arg103Cys/Arg287Gln (rs17057255 et rs751141) modulent significativement l'activité de la sEH (Przybyla-Zawislak *et al.*, 2003). Plus précisément, les polymorphismes rs41507953 et rs57699806 sont responsable d'une diminution de l'activité phosphatase et les SNPs rs751141 et rs17057255 sont associés à une augmentation de cette activité par rapport aux allèles sauvages (Gomez *et al.*, 2004; Bernstein *et al.*, 1977). Ainsi, certains de ces SNP sont associés à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires bien que les résultats de ces études soient controversés et discordants selon les ethnies (Tableau 1) (Zordoky *et al.*, 2010; Przybyla-Zawislak *et al.*, 2003; Fornage *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Burdon *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, deux SNP ont particulièrement été étudiés :

Le SNP rs41507953 : La mutation Lys55Arg possède une fréquence allélique de 15% au sein de la population générale (Srivastava *et al.*, 2004). Elle est associée à une augmentation du ratio hydrolase/phosphatase car ce SNP est responsable d'une augmentation de l'activité hydrolase et d'une diminution de l'activité phosphatase. Il en résulte une diminution de la disponibilité des EETs associée à une incidence plus élevée de maladies coronariennes (Lee *et al.*, 2006). De plus, il a été montré chez les américains caucasiens mais pas chez les afro-américains que la présence de ce SNP est associée à une diminution de la dilatation des artères de résistance dépendante de l'endothélium (Lee *et al.*, 2011).

Le SNP rs751141 : La mutation Arg287Gln est présente chez 10 à 15 % de la population générale (Burdon *et al.*, 2008). Elle est associée à une activité hydrolase diminuée (Srivastava *et al.*, 2004), une localisation subcellulaire altérée et une augmentation de l'activité phosphatase *in vitro*. (EnayetAllah *et al.*, 2008). Ce

polymorphisme entraîne un changement de la structure quaternaire de l'enzyme en diminuant la stabilité de la liaison ionique inter-monomère. Étonnamment, malgré l'augmentation attendue de la disponibilité des EETs, ce SNP est associé à un risque accru de calcification coronaire (Fornage *et al.*, 2004). Cependant, aucun lien n'a été clairement établi entre la présence de ce SNP et la survenue de maladies coronariennes (Fornage *et al.*, 2004). Ces effets pourraient donc s'expliquer par l'impact de cette mutation sur l'activité phosphatase de la sEH pouvant jouer un rôle important dans l'homéostasie lipidique et glucidique. Effectivement, la mutation Arg287Gln est associée à une augmentation de l'insulino-résistance chez les patients diabétiques de type 2 (DT2) (Ohtoshi *et al.*, 2005) mais également à des concentrations plasmatiques de cholestérol et de triglycérides supérieures à la moyenne (Sato *et al.*, 2004). Enfin, contrairement à la mutation Lys55Arg, les afro-américains porteurs de cette mutation montrent une augmentation de la capacité vasodilatatrice des artères de conductance qui n'est pas retrouvée chez les américains d'origine caucasienne. Par ailleurs, une mutation fréquente située sur la portion 3' non traduite (3' Untranslated Region ou 3'UTR), le SNP rs1042032, semble être associée au devenir de la fonction rénale chez des patients transplantés rénaux (Lee *et al.*, 2008). Plus précisément, être porteur de cette mutation semble avoir un rôle protecteur sur le greffon rénal (Lee *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, il est difficilement prédictible de savoir si cette mutation possède un effet propre ou si elle est en déséquilibre de liaison avec d'autres SNP susceptibles de modifier certaines fonctions de l'organisme. Finalement, la présence de SNP dans les zones non codantes (introns, 3' et 5' UTR) pourrait jouer un rôle dans l'activité de la sEH ou son expression par des phénomènes d'épissage alternatif ou de modification de la vitesse de transcription et/ou de traduction. En effet, chez les participants de l'étude Diabetes Heart Study (Burdon *et al.*, 2008), ces mutations sont

susceptibles d'être associées à une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires (accidents ischémiques, calcifications aortiques et coronariennes, diminution de l'épaisseur intima-media carotidienne) (Fornage *et al.*, 2004; Gschwendtner *et al.*, 2008).

Tableau 1 : Principaux polymorphismes du gène EPHX2 étudiés dans les maladies cardiovasculaires.

Localisation	Mutation	Impact sur l'activité de la sEH <i>in vitro</i>	Impact sur les maladies cardiovasculaires <i>in vivo</i>
Exon 2	Lys55Arg	↑ Activité hydrolase ↓ Activité phosphatase	Augmentation du risque de coronaropathies chez les Caucasiens
Exon 3	Arg103Cys	↑ Activité hydrolase ↑ Activité phosphatase	Non étudié
Exon 4	Cys154Tyr	↑ Activité hydrolase ↓ Activité phosphatase	Non étudié
Exon 8	Arg287Gln	↓ Activité hydrolase ↑ Activité phosphatase	- Augmentation du risque de calcifications coronariennes chez les afro-américains - Augmentation du risque d'insulino résistance - Augmentation du taux de triglycérides et de cholestérol - Augmentation de la dilatation endothélium-dépendante chez les afro-américains

2.3 Inhibiteurs pharmacologiques de la sEH

D'après les résultats obtenus à partir d'expérimentations animales et en lien avec l'impact des polymorphismes génétiques chez l'homme, il est maintenant clairement établi qu'augmenter les quantités circulantes d'EETs par le biais d'agents pharmacologiques inhibant la sEH est une stratégie thérapeutique d'intérêt dans la prise en charge des maladies cardiovasculaires. Depuis le début des années 2000, le développement et la synthèse d'inhibiteurs pharmacologiques possédant une forte affinité pour la sEH et des propriétés pharmacocinétiques favorables permettant une

administration par voie orale est en plein essor (Figure 6). Beaucoup d'efforts ont été réalisés pour inhiber spécifiquement l'activité époxyde hydrolase de l'extrémité C-Tle de la sEH sans interagir avec la partie phosphatase (Kim *et al.*, 2004; Morisseau *et al.*, 1999). Les premières familles d'inhibiteurs de la sEH sont les *trans*-3-phénylglycidols et les chalcone-oxydes, possédant une forte homologie structurale (Dietze *et al.*, 1991). Ensuite, des études approfondies du site actif de la sEH ont permis le développement d'inhibiteurs de nouvelle génération dérivés de l'urée et plus récemment des benzoxazolones substituées en position 4 et des sulfoxydes.

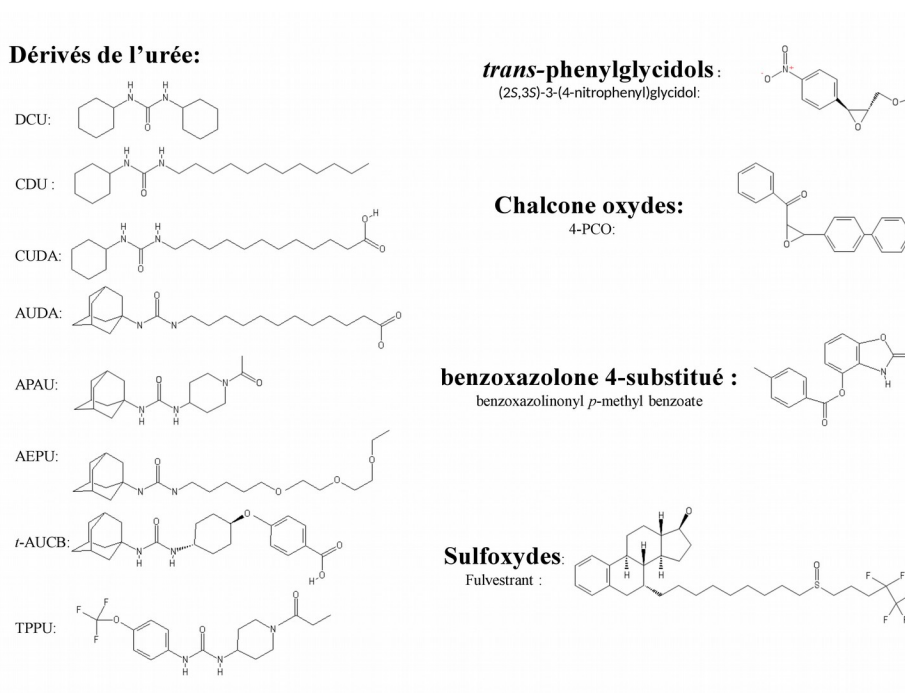


Figure 7 : Principaux inhibiteurs pharmacologiques de la sEH.

DCU: *N,N'*-dicyclohexylurée, CDU: *N*-cyclohexyl-*N'*-dodécylurée, CUDA: Acide *N*-cyclohexyl-*N'*-dodécanoïque uréique, AUDA: Acide *N*-adamantanyl-*N'*-dodécanoïque uréique, APAU: 1-(1-acétylpipéridin-4-yl)-3-adamantanylurée, AEPU: 1-adamantanyl-3-(5-(2-(2-éthoxyéthoxy)éthoxy)pentyl)urée, t-AUCB: Acide *trans*-4[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoïque, TPPU: 1-trifluorométhoxyphényl-3-(1-propionylpipéridin-4-yl)urée, 4-PCO: 4-phénylchalcone-oxyde (d'après Duflot *et al.*, 2014)

2.3.1 Les *trans*-3-phénylglycidols

Ces composés sont des inhibiteurs énantiosélectifs de la sEH à fixation lente, exceptés ceux possédant un groupement hydroxyle. Ces composés ont une concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) de l'ordre du μM et affectent peu la mEH (Morisseau *et al.*, 1998). Le (2*S*,3*S*)-3-(4-nitrophényl)glycidol est 750 fois plus puissant que l'énantiomère (2*R*,3*R*). De manière similaire, le (2*R*,3*R*)-1-benzoyloxy-2,3-époxy-3-(4-nitrophényl)propane est également un meilleur inhibiteur que son antipode, suggérant une énantiosélectivité importante dans la fixation de l'inhibiteur sur la sEH pour cette famille de composés (Morisseau *et al.*, 1998)

2.3.2 Les chalcone-oxydes

Les chalcone-oxydes substitués sont des inhibiteurs plus puissants que les *trans*-3-phénylglycidols. Leur mécanisme d'action est caractérisé par une liaison covalente entre l'inhibiteur et l'enzyme, formant ainsi un intermédiaire stabilisé électroniquement. L'inconvénient majeur de ces composés est leur instabilité en présence de glutathion limitant ainsi leur utilisation *in vivo* (Morisseau *et al.*, 1998). Des essais sur la sEH recombinante murine et humaine ont permis de démontrer que le potentiel inhibiteur des chalcone-oxydes augmente avec la substitution en 4 et 4' de groupements *n*-pentyle, *n*-phényle et *n*-propyle car ces derniers possèdent des contraintes stériques en accord avec la configuration tridimensionnelle de l'enzyme.

2.3.3 Les dérivés de l'urée

Cette famille comprend de nombreux composés stables et sélectifs de la sEH possédant une meilleure biodisponibilité que ses prédécesseurs. Ces dérivés sont en effet de puissants inhibiteurs de la sEH humaine et murine avec une CI₅₀ de l'ordre du nM

pour les derniers composés mis au point de cette famille (Morisseau *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005; Morisseau *et al.*, 2002). Le *N,N'*-dicyclohexylurée (DCU) a été le premier inhibiteur utilisé *in vivo* permettant de démontrer le bénéfice sur le plan cardiovasculaire d'une inhibition de la sEH (Yu *et al.*, 2000), bien que ses propriétés physico-chimiques ne soient pas satisfaisantes pour une formulation galénique adaptée. La substitution d'un groupement cyclohexyle par une chaîne alkyle à 12 carbones pour former le *N*-cyclohexyl-*N'*-dodécylurée (CDU) a permis d'améliorer ces caractéristiques, mais l'usage de ce composé fut alors limité par la rapidité de sa dégradation par les enzymes microsomaux hépatiques (CYP450 hydroxylase, alcool déshydrogénase et aldéhyde déshydrogénase), qui transforment ce composé en un dérivé carboxylique hydrosoluble ayant une activité inhibitrice partielle (Watanabe *et al.*, 2003). Afin d'améliorer l'hydrosolubilité de cette classe de composés pour son administration par voie orale, un acide carboxylique a été ajouté en fin de chaîne alkyle afin d'obtenir l'acide *N*-cyclohexyl-*N'*-dodécanoïque uréique (CUDA), puis le second groupement cyclohexyle a été remplacé par un groupement adamantyle afin de former l'acide *N*-adamantanyl-*N'*-dodécanoïque uréique (AUDA) et le 1-adamantanyl-3-(5-(2-(2-éthoxyéthoxy)éthoxy)pentyl)urée (AEPU). Cependant, ces composés faisaient toujours l'objet d'un métabolisme intense à cause de la persistance du groupement alkyl. Pour éliminer la possibilité de survenue de β -oxydation, la chaîne alkyle a été remplacée par un groupement pipéridine ou phényle possédant une structure conformationnelle proche formant ainsi le 1-(1-acétylpiperidin-4-yl)-3-adamantanylurée (APAU), première molécule utilisée lors d'essais cliniques, et l'acide *cis*- ou *trans*-4[4-(3-adamantan-1-yl-uréido)-cyclohexyloxy]-benzoïque (*c*-AUCB, *t*-AUCB) qui possède de meilleures propriétés métaboliques que les précédents composés avec une chaîne alkyle (Liu *et al.*, 2013). Finalement, le groupement adamantyle a été remplacé par un groupement 4-

trifluoro-methoxy-phenyl (TPPU) afin d'améliorer la stabilité et ainsi d'optimiser la CI_{50} , la demi-vie ($t_{1/2}$) et la concentration maximale (C_{max}), en faisant un meilleur candidat que l'APAU pour les essais cliniques (Morisseau *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Le mécanisme d'action supposé met en évidence la formation d'une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle du composé et le groupement hydroxyle des Tyr381 et Tyr465 de la sEH. Ce composé interagit également avec la Gln382 afin de stabiliser la charge partielle négative de l'oxygène du groupement époxyde. Par ailleurs, les deux groupements azotés du groupement urée peuvent interagir avec le groupement carboxylate de l'Asp335 afin de prévenir l'attaque nucléophile de la sEH sur les EETs (Figure 8) (Argiriadi *et al.* 2000).

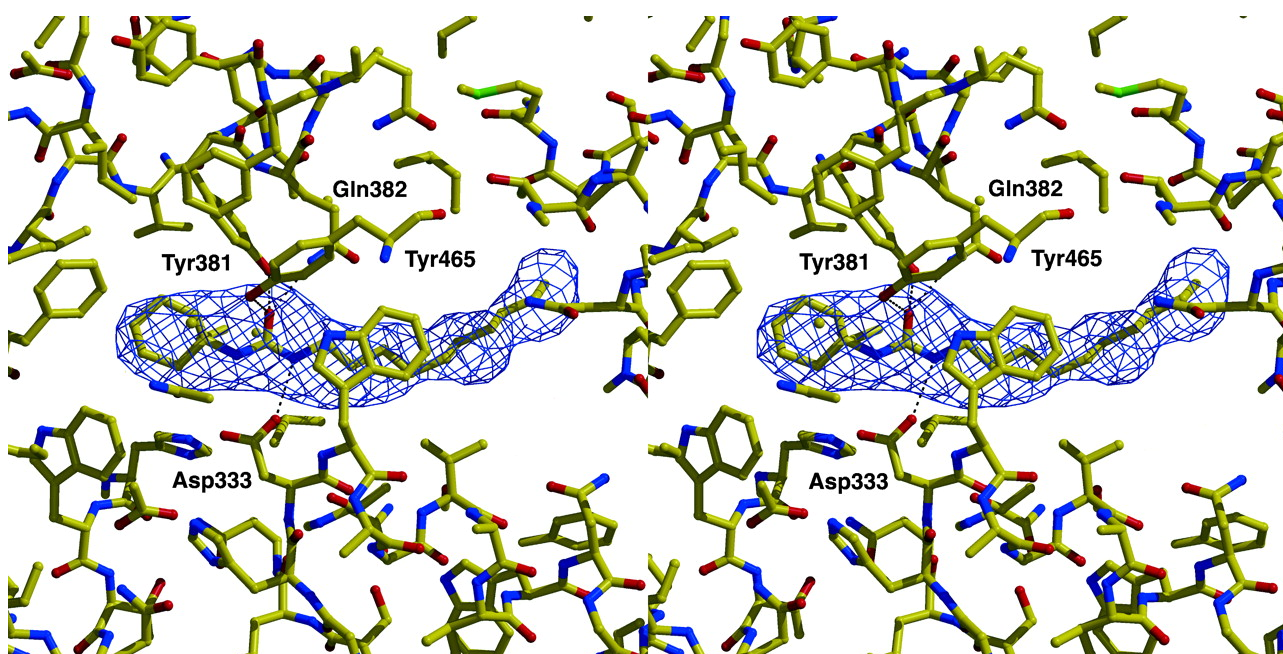


Figure 8 : Représentation par densité électronique du complexe sEH-CDU (d'après Argiriadi *et al.*, 2000).

Ainsi, les dérivés urées 1,3-disubstitués possédant un groupement polaire sont de puissants inhibiteurs de la sEH avec une forte affinité pour celle-ci et réagissant en

quantité stœchiométrique pour permettre d'obtenir une CI_{50} de l'ordre du nM et un profil pharmacocinétique favorable en vue de leur administration *in vivo*.

2.3.4 Les benzoxazolones 4-substituées

Ces nouveaux composés sont des inhibiteurs pharmacologiques de la sEH prometteurs du fait de la possibilité de les administrer par voie orale (Tang *et al.*, 2013). Substituer le noyau benzoxazolone par un groupement benzoate ou bésilate, un AA ou un groupement glycosyle stabilise la structure du pharmacophore tout en assurant l'efficacité du composé. Le profil pharmacocinétique et toxique de ces molécules ayant déjà été effectué pour leur utilisation comme agent antibactérien ou anti-inflammatoire, le développement de nouveaux composés possédant ce noyau pour inhiber la sEH fait l'objet d'une attention particulière (Tang *et al.*, 2013).

2.3.5 Les sulfoxydes

Les sulfoxydes sont des inhibiteurs compétitifs de la sEH avec en chef de file le fulvestrant, possédant une CI_{50} dans les limites basses du nM pour la sEH humaine (Morisseau *et al.*, 2013b). Le fulvestrant se fixe sur le site catalytique de la sEH par le biais d'une interaction entre l'atome de soufre du sulfoxyde et l'Asp335 similaire à celle observée pour les dérivés de l'urée (Morisseau *et al.*, 2013b, [Schmelzer et al.](#) 2005). L'atome d'oxygène du pharmacophore peut également établir une liaison avec des AA clés du site catalytique (Tyr383 et Tyr466) (Morisseau *et al.*, 2013b, [Schmelzer et al.](#) 2005). L'originalité du fulvestrant réside dans sa capacité à être le premier inhibiteur de la sEH avec un groupement sulfoxyde possédant une puissance d'inhibition similaire à celle observée avec les dérivés de l'urée. Tout comme les benzoxazolones, l'utilisation de cette classe de composés chez l'homme pour le traitement des cancers métastatiques

du sein HER2-positifs en fait un candidat de choix pour une utilisation future en vue d'inhiber la sEH (Fakhr *et al.*, 2009). En effet, les chaînes alkyles fluorées semblent occuper la plus petite des deux poches lipophiliques du site actif de la sEH tandis que le groupement stéroïde se place dans la plus grande poche. Le cycle aromatique cyclopentyle du fulvestrant se place quant à lui à l'entrée du site catalytique de la sEH (Figure 9) (Morisseau *et al.*, 2013b).

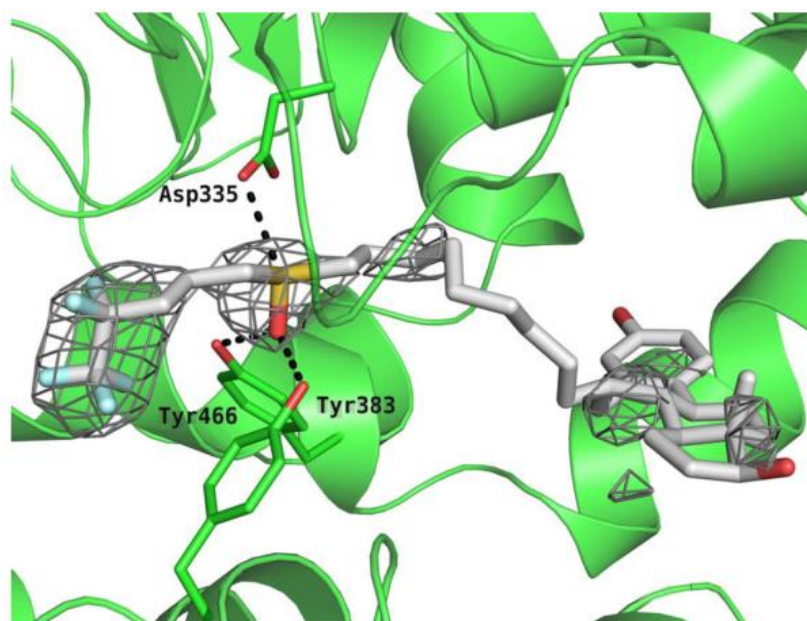


Figure 9 : Site actif du domaine hydrolase complexé avec le fulvestrant (d'après Morisseau *et al.*, 2013b).

2.4 Effets des inhibiteurs pharmacologiques de la sEH

De nombreuses expérimentations animales ont démontré les bénéfices obtenus par l'utilisation d'un inhibiteur de la sEH dans différents modèles de maladies cardiovasculaires (Tableau 2) (Bellien *et al.*, 2011).

En accord avec les propriétés natriurétiques et vasodilatatrices des EETs, il a été prouvé que l'administration d'une simple dose de DCU induisait une diminution transitoire de la pression artérielle (PA) chez des rats spontanément hypertendus (SHR) (Yu *et al.*,

2000). Les inhibiteurs de la sEH possèdent également la capacité de diminuer la PA dans des modèles d'HTA induite par l'Ang-II. Indépendamment de la baisse de la PA, l'inhibition de la sEH par l'AUDA est capable de corriger la dysfonction endothéliale des artères coronaires (Gao *et al.*, 2011). Cet effet des inhibiteurs de la sEH est très important car la dysfonction endothéliale joue un rôle prépondérant dans la morbi-mortalité cardiovasculaire des patients souffrant d'HTA, et celle-ci n'est pas toujours prévenue par les antihypertenseurs utilisés actuellement en clinique (Bellien *et al.*, 2011; Bellien *et al.*, 2012). De plus, les inhibiteurs de la sEH semblent bénéfiques dans la prévention de la dysfonction et de l'hypertrophie cardiaque secondaires à l'HTA (Gao *et al.*, 2011; Loch *et al.*, 2007). La cardioprotection induite par ces composés a également pu être vérifiée dans des modèles d'ischémie-reperfusion cardiaque (Motoki *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2010) et semble passer par la voie PI3/Akt et les K_{ATP} , améliorant la survie des cardiomyocytes (Bellien *et al.*, 2011). Concernant les maladies métaboliques, la capacité des EETs à augmenter la libération et la sensibilité de l'insuline parallèlement à leurs effets cardiaques en fait de nouveaux candidats potentiels dans la prise en charge du DT2 (Zhang *et al.*, 2011; Luria *et al.*, 2011). L'utilisation d'inhibiteurs de la sEH montre une action hypoglycémiante dans des modèles de diabète de type 1 (DT1) et de DT2 et semble prévenir la perte des cellules β du pancréas (Luo *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Il existe cependant des données contradictoires sur l'effet des inhibiteurs de la sEH dans les maladies rénales. D'une part, l'inhibition de la sEH prévient les dommages rénaux dans le modèle d'HTA sensible au sel et à l'Ang-II et dans le modèle de DT1 induit par la streptozotocine (Imig *et al.*, 2005; Olearczyk *et al.*, 2009; Imig *et al.*, 2005b; Elmarakby *et al.*, 2011). D'autre part, dans un modèle de néphrectomie 5/6^{ème} (mimant l'insuffisance rénale chronique chez l'homme), le *c*-AUCB augmente l'albuminurie et ne prévient ni la

glomérulosclérose, ni les lésions tubulo-interstitielles. Le mécanisme hypothétique avancé est que l'utilisation des inhibiteurs de la sEH serait susceptible de favoriser le métabolisme de l'ARA vers la voie des LOX augmentant la formation de composés pro-inflammatoires (Jung *et al.*, 2010).

Tableau 2. Principaux effets de l'inhibition de la sEH dans des modèles animaux de maladies.

Cible	Effets de l'inhibition de la sEH	Modèles
Rein	<ul style="list-style-type: none"> - Prévention des lésions rénales - Augmentation de l'albuminurie sans prévenir les lésions glomérulosclérotiques ni tubulo-interstitielles 	<ul style="list-style-type: none"> - Modèles murins d'hypertension induite par le sel ou l'angiotensine-II et de diabète de type 1 induit par la streptozotocine - Néphrectomie 5/6^{ème} chez la souris
Coeur	<ul style="list-style-type: none"> - Correction de la dysfonction endothéliale vasomotrice - Prévention de la dysfonction et de l'hypertrophie cardiaque - Cardioprotection lors de lésions d'ischémie-reperfusion myocardiques - Prévention et traitement de l'insuffisance cardiaque 	<ul style="list-style-type: none"> - Souris avec hypertension rénovasculaire - Souris avec hypertension induite par l'angiotensine II - Souris avec diabète de type 2 induit par un régime riche en graisses - Souris avec occlusion coronaire définitive.
Pancréas	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de l'homéostasie glucidique par augmentation de la libération et de la sensibilité à l'insuline - Prévention de la perte et de la dysfonction des cellules β pancréatiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Souris avec diabète de type 1 induit par la streptozotocine et diabète de type 2 induit par un régime riche en graisse - Souris avec diabète de type 1 induit par la streptozotocine
Vaisseau x	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la pression artérielle - Abolition de la dysfonction endothéliale - Prévention du remodelage vasculaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Rats spontanément hypertendus, hypertension induite par l'angiotensine II, sténose de l'artère rénale. - Souris avec hypertension induite par l'angiotensine II et souris avec diabète de type 2 induit par un régime riche en graisses - Souris déficiente en apolipoprotéine E avec injection d'angiotensine II

Dans leur ensemble, les données expérimentales prouvent que les inhibiteurs de la sEH n'améliorent pas seulement la fonction endothéliale et les lésions cardiovasculaires, mais peuvent également exercer une action bénéfique sur les maladies métaboliques. Ainsi, ces agents pourraient être particulièrement utiles dans le traitement et la prévention de ces maladies. L'aboutissement de 2 essais cliniques sont par ailleurs porteurs de résultats prometteurs (Chen *et al.*, 2012; Lazaar *et al.*, 2016).

3 Matériels et méthodes

3.1 Réactifs

Les acides (\pm)5(6)-époxy-8Z,11Z,14Z-eicosatriénoïque (5,6-EET); (\pm)8(9)-époxy-5Z,11Z,14Z-eicosatriénoïque (8,9-EET); (\pm)11(12)-époxy-5Z,8Z,14Z-eicosatriénoïque (11,12-EET); (\pm)14(15)-époxy-5Z,8Z,11Z-eicosatriénoïque (14,15-EET); (\pm)5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z-eicosatriénoïque (5,6-DHET); (\pm)8,9-dihydroxy-5Z,11Z,14Z-eicosatriénoïque (8,9-DHET); (\pm)11,12-dihydroxy-5Z,8Z,14Z-eicosatriénoïque (11,12-DHET); (\pm)14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Zeicosatriénoïque (14,15-DHET); (\pm)11(12)-dihydroxy-5Z,8Z,14Z-eicosatriénoïque-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,20 (11,12-DHET-d11); et (\pm)14(15)-époxy-5Z,8Z,11Zeicosatriénoïque-5,6,8,9,11,12,14,15 (14,15-EET-d8) ont été achetés chez Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). La colonne chromatographique Kinetex C18 2.6 μm (50 \times 3 mm) a été fournie par Phenomenex (Le Pecq, France). L'eau et le méthanol (MeOH) de qualité CLHP ont été fournis par Carlo Erba (Fontenayaux-Roses, France). L'acide formique (HCOOH; 98–100%), la soude (NaOH), le formiate d'ammonium et le dichlorométhane (DCM) proviennent de VWR Chemicals (Leuven, Belgium). Le chlorure de sodium (NaCl) 0,9% provient d'Aguettant (Lyon, France). Les tubes BD

Vacutainer Citrate (9NC, 3,2%, 3,5 mL), BD Vacutainer EDTA (K2E, 7,2 mg, 4 mL) et BD Vacutainer Hépariné (LH, 68 IU, 4 mL) proviennent de BD Vacutainer (Plymouth, UK).

3.2 Instrumentation et conditions opératoires

L'appareillage chromatographique est un système UFLC Prominence Shimadzu avec un dégazeur DGU-20A3, une pompe LC-20AB, un autoinjecteur SIL-20ACHT et un four pour colonnes chromatographiques CTO-20AC (Shimadzu, Prominence, Kyoto, Japan). Cette chaîne CLHP est couplée à un spectromètre de masse 4500QTRAP équipé d'une source d'électronébulisation utilisée en mode négatif (Sciex, Toronto, Canada). Le contrôle de l'appareillage et l'intégration des données chromatographiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Analyst v1.6.2. La quantification des différents composés a été réalisée en utilisant le mode "MRM" (Multiple Reaction Monitoring) afin d'étudier les transitions du précurseur déprotoné (anion moléculaire de l'ion père) en produit (ion fils obtenu après fragmentation). Concernant l'optimisation sur le SM, les différents composés (5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; 14,15-EET; 5,6-DHET; 8,9-DHET; 11,12-DHET; 14,15- DHET; 14,15-EET-d11; et 11,12-DHET-d8) ont été préparés à une concentration de 10 ng/mL dans le MeOH et introduits individuellement dans l'appareil par infusion directe à l'aide d'un pousse-seringue programmé à un débit de 7 μ L/min. Le rapport masse sur charge (m/z) des 4 EETs et des 4 DHETs étant les mêmes (319 et 337 respectivement), nous avons choisi d'utiliser les transitions "ion père/ion fils" spécifiques de chaque analyte afin de limiter le risque d'interférence (Figure 10). De ce fait, la sélectivité de la méthode repose sur la combinaison de ces transitions MRM et de la séparation chromatographique caractérisée par le temps de rétention des composés. Les paramètres optimaux de la source d'électronébulisation sont récapitulés ci-dessous

(tableau 3). Les paramètres composés-dépendants (potentiel de déclustérisation ou DP, énergie de collision ou CE, potentiel de sortie ou CXP) ont quant à eux été optimisés pour chaque transition MRM (tableau 4).

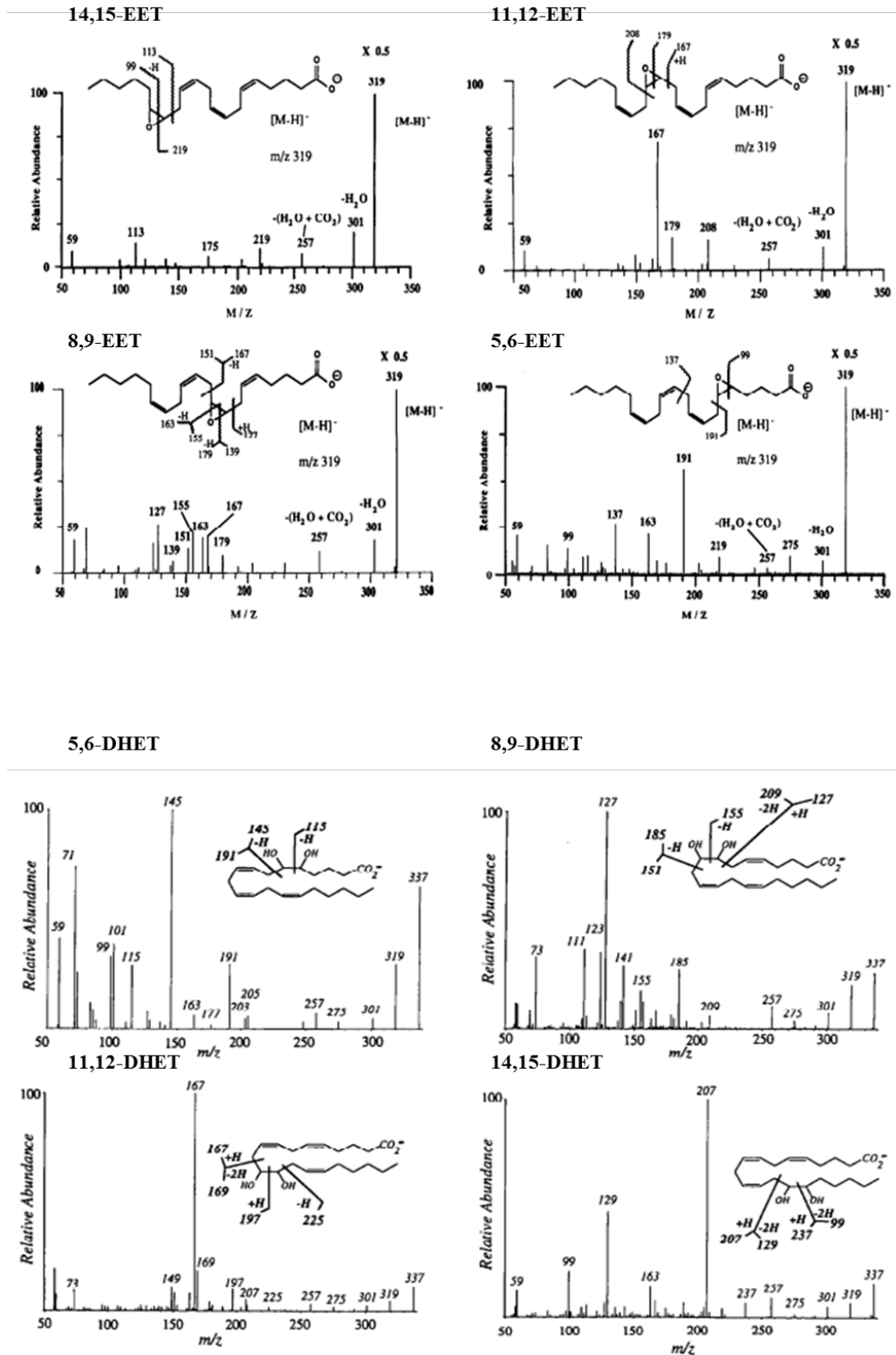


Figure 10 : Spectres de fragmentation des EETs et DHETs.

Tableau 3 : Paramètre du spectromètre de masse pour l'analyse des EETs et DHETs.

Tension d'électronébulisation	- 4500 V
Gaz de nébulisation	60 psi
Gaz de désolvatation	50 psi
Gaz rideau	30 psi
Température de la source	500°C
Potentiel d'entrée	- 13 V
Dissociation activée par collision	Moyen

Tableau 4 : Paramètres d'optimisation des différents composés.

Analyte	Transition MRM		Paramètres du MS			Etalon interne deutéré (IS)	Temps de rétention (min)
	m/z (MS1)	m/z (MS3)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)		
14,15-DHET	337,1	207,1	-90	-24	-9	11,12-DHET-d ₁₁	3,63
11,12-DHET	337,1	167	-90	-26	-9	11,12-DHET-d ₁₁	3,69
8,9-DHET	337,1	185	-80	-22	-15	11,12-DHET-d ₁₁	3,77
5,6-DHET	337,1	144,9	-70	-24	-5	11,12-DHET-d ₁₁	3,91
14,15-EET	319,1	219,1	-90	-16	-9	14,15-EET-d ₈	4,25
11,12-EET	319,1	207,9	-70	-16	-9	14,15-EET-d ₈	4,36
8,9-EET	319,1	126,9	-65	-24	-9	14,15-EET-d ₈	4,40
5,6-EET	319,1	191	-80	-13	-14	14,15-EET-d ₈	4,47
11,12-DHET-d ₁₁	348,1	166,9	-135	-28	-5		3,68
14,15-EET-d ₈	327,1	226	-90	-18	-18		4,22

La séparation chromatographique a été effectuée à l'aide d'une colonne Kinetex C18 (2.6µm, 50x3 mm) possédant la technologie core-shell. La température de l'injecteur a été programmée à +8°C et le four dans lequel est situé la colonne chromatographique à +30°C, le volume injecté est de 20 µL et le débit des phases mobiles réglé à 600 µL/min. Les phases mobiles sont du MeOH acidifié à 0,2% d'HCOOH (phase A) et de l'eau à 2 mM de formiate d'ammonium acidifiée à 0,2% d'HCOOH (phase B). La méthode a le gradient d'élution suivant : 5% de A et 95% de B de 0 à 0,5 min puis 80% de A et 20% de B de 0,5 à 1 min puis 90% de A et 10% de B

de 1 à 4 min puis 95% de A et 5% de B de 4 à 5 min puis retour aux conditions initiales de 5 à 6 min jusqu'à 7,5 min afin d'équilibrer la colonne avec la composition initiale de phases mobiles.

3.3 Préparation des solutions standards

Pour la préparation des gammes de calibration et des contrôles internes de qualité (CIQ), une solution stock (A1) contenant tous les analytes à la concentration de 6 µg/mL a été préparée dans du MeOH. Une solution de travail (A2) a ensuite été préparée par dilution au 1/10ème de la solution A1. Cette solution A2 est ensuite diluée pour la préparation du standard à une concentration finale comprise entre 0,25 et 20 ng/mL dans du NaCl à 0,9%. Les CIQ sont préparés dans le MeOH et conservés à -80°C à 3 niveaux de concentrations : 0,75 ng/mL (CIQ Bas), 6 ng/mL (CIQ Moyen) et 18 ng/mL (CIQ Haut). Selon les recommandations fournisseurs, la stabilité des solutions stocks des EETs et DHETs conservés à -80°C est d'au moins 1 an.

3.4 Préparation de l'échantillon

300 µL de NaCl 0,9% ou de plasma sont conditionnés à température ambiante et enrichis avec 10 µL d'étalons internes deutérés (11,12-DHETd11 et 14,15-EETd8 à 200 ng/mL) dans un cône Eppendorf de 1,5 mL. Un mL de MeOH est ajouté afin de précipiter les protéines et le cône est agité 15 secondes puis centrifugé à 16100 g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est ensuite décanté dans un tube Chromacol® de 5 mL auquel est ajouté 100 µL d'HCOOH à 10%. Les lipides contenus dans l'échantillon sont ensuite extraits à l'aide de la technique de Bligh & Dyer (Bligh et Dyer, 1959). Pour ce faire, 500 µL de DCM sont ajoutés deux fois et l'échantillon est agité après chaque ajout. Ensuite, 500 µL d'H₂O sont rajoutés, l'échantillon est agité à

nouveau et la phase organique est récupérée après centrifugation à 1690 g pendant 10 min à +4°C puis évaporée à sec sous un flux d'azote. Afin de libérer les EETs et DHETs estérifiés, l'extrait sec est soumis au processus de saponification avec 1mL de NaOH à 1,25M chauffé à +90°C pendant 20 min et agité 10 secondes toutes les 5 min. La saponification est ensuite stoppée par refroidissement du tube dans un bain de glace pendant 5 min et 1 mL d'HCOOH à 10% est introduit dans le tube pour acidifier la solution. Les EETs et DHETs sous forme libre sont ensuite extraits par 2 mL de DCM. Après agitation et centrifugation à 1690 g pendant 10 min à +4°C, la phase organique est décantée, évaporée à sec sous flux d'azote et l'extrait sec est remis en solution dans 100 µL de MeOH avant injection.

3.5 Essais de répétabilité et de reproductibilité

Les EETs et DHETs étant des composés endogènes, du NaCl à 0,9% a été utilisé comme matrice de substitution pour la détermination de la variabilité des essais de répétabilité et de reproductibilité. La précision des tests de répétabilité a été calculée à partir de l'analyse des CIQ bas, moyen et haut en 6 réplicats. Les essais de reproductibilité ont été conduits par le calcul de la précision des CIQ bas, moyen et haut en duplicat durant 5 jours (6 essais). Les étalons internes deutérés (14,15-EET-d₈ et 11,12-DHET-d₁₁) ont été introduits dans l'échantillon avant l'ajout du MeOH utilisé pour la précipitation protéique. La limite de quantification (LQ) est fixée à 5 fois le signal d'un échantillon dépourvu d'EETs et de DHETs (signal/bruit >5). Les essais de répétabilité et de reproductibilité ont été considérés comme satisfaisants si la précision moyenne était comprise entre 80 et 120 % selon les recommandations de la FDA (Food and Drug Administration) et de l'EMA (European Medicine Agency).

3.6 Rendement d'extraction, effet de matrice et efficacité du processus

Le rendement d'extraction, les effets de matrice et l'efficacité du processus ont été évalués en utilisant la méthode utilisée par Matuszewski *et al* (Matuszewski *et al.*, 2003). Les courbes de calibration ont été réalisées dans 3 groupes d'échantillons à des concentrations allant de 0 à 20 ng/mL avec une quantité fixe de 14,15-EET-d₈ et de 11,12-DHET-d₁₁ (2 ng par échantillon).

Le groupe 1 correspond à une gamme réalisée dans du MeOH (solution de reconstitution des standards analytiques). Les groupes 2a et 2b sont des échantillons enrichis après extraction dans du NaCl 0,9% et du plasma respectivement. Les groupes 3a et 3b sont des échantillons enrichis avant extraction dans du NaCl 0,9% et du plasma respectivement.

Les effets de matrices (ME), le rendement d'extraction (RE) et l'efficacité du processus (PE) sont obtenus par le ratio des aires sous la courbe (ASC) entre les différents groupes calculés pour chaque niveau de concentration (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 ng/mL) par les formules suivantes : $ME = (\text{Groupe 2} / \text{Groupe 1}) \times 100$, $RE = (\text{Groupe 3} / \text{Groupe 2}) \times 100$ et $PE = (\text{Groupe 3} / \text{Groupe 1}) \times 100$.

Du fait de la présence d'EETs et de DHETs endogènes, les ASC obtenues à partir du plasma ont été normalisées par étalonnage linéaire (ordonnée à l'origine = 0). La pente et la linéarité des courbes de calibrations des 3 groupes ont été obtenues en utilisant le ratio des ASC des analytes sur celui de l'étalon interne deutéré pour chaque niveau de concentration. L'absence d'effet de charge a été vérifié par l'injection d'un échantillon blanc après l'injection successive de 3 CIQ hauts (18 ng/mL).

3.7 Etude de stabilité

Les concentrations d'EETs et de DHETs d'un pool de plasma humain ont été mesurées avant et après 3 cycles de congélation-décongélation en triplicat avec différents anticoagulants (EDTA, héparinate de lithium et citrate de sodium). Les échantillons plasmatiques ont été conservés à -80°C et décongelés à température ambiante 3 fois. La stabilité à court terme des échantillons a été évaluée en réanalysant les échantillons présents dans l'injecteur 48h après leur premier passage. La stabilité à long terme a été mesurée en conservant les échantillons un mois à -80°C.

3.8 Quantification des EETs et DHETs : application clinique

Des échantillons de sang ont été prélevés chez 14 volontaires sains et 5 patients avec HTA non fumeurs inclus dans un protocole de recherche clinique consistant en une stimulation de l'endothélium vasculaire. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local (comité de protection des personnes de l'inter-région Nord-Ouest I) et tous les patients ont donné leur consentement éclairé. L'étude a été enregistrée sur <https://eudract.ema.europa.eu> sous le numéro d'identification RCB: 2013-A01107-38. Concernant l'étude de la fonction endothéliale, le bras non-dominant du volontaire est introduit dans une enceinte thermostatée remplie d'eau en utilisant un gant imperméable fixé sur l'appareil (Figure 11) (Bellien *et al.*, 2012; Joannidès *et al.*, 2002). Le diamètre ainsi que le débit sanguin de l'artère radiale avant et pendant la stimulation ont été mesurés en utilisant un appareil d'écho-tracking vasculaire haute résolution couplé à un système Doppler (NIUS 02, Asulab) (Bellien *et al.*, 2012; Joannidès *et al.*, 2002). Des prélèvements sanguins ont été réalisés localement dans des tubes EDTA préalablement conditionnés dans la glace à l'état basal à +34°C et lors de la stimulation maximale à +44°C en utilisant un cathéter 4-F inséré dans la portion distale de la veine antécubitale.

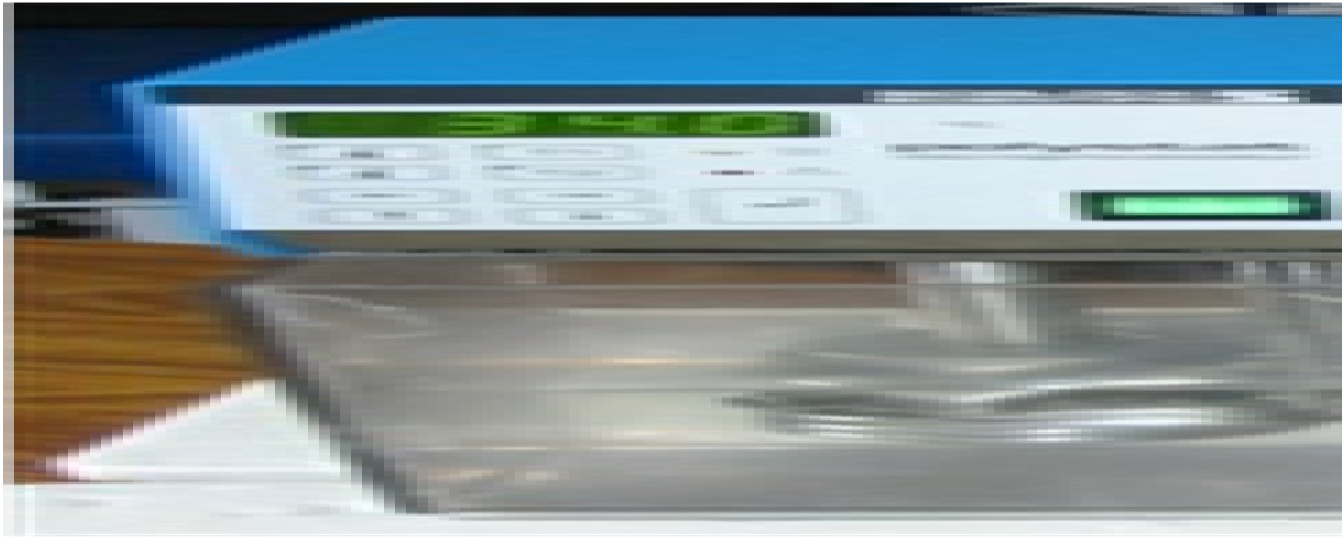


Figure 11 : Représentation du montage utilisé pour réaliser la stimulation de l'endothélium vasculaire (d'après Bellien et al., 2012 et Joannidès et al., 2002).

Une fois prélevés, les échantillons ont été immédiatement centrifugés à 1690 g pendant 3 min à +4°C et le plasma décanté dans un cryotube congelé dans l'azote liquide avant conservation à -80°C jusqu'au moment de l'analyse.

3.9 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel NCSS (version 07.1.14). Les résultats sont présentés en valeurs moyennes avec leur écart-type (SD). La linéarité des courbes de calibration a été évaluée à l'aide du coefficient de détermination (r^2). Les variations des paramètres clinico-biologiques au cours du chauffage cutané distal ont été analysées à l'aide de tests appariés t de Student.. Le test de corrélation de Pearson a été utilisé pour déterminer la relation linéaire entre la variation du total EET + DHET et la variation du flux sanguin au cours du chauffage. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

4 Résultats

4.1 Validation analytique

En utilisant une méthode basée sur la CLHP-SM/SM, nous sommes parvenus à obtenir une séparation spécifique de chaque analyte dans du MeOH en 7,5 min (Figure 12A). Cependant, le 5.6-EET n'a pas pu être détecté après traitement de l'échantillon (Figure 12B).

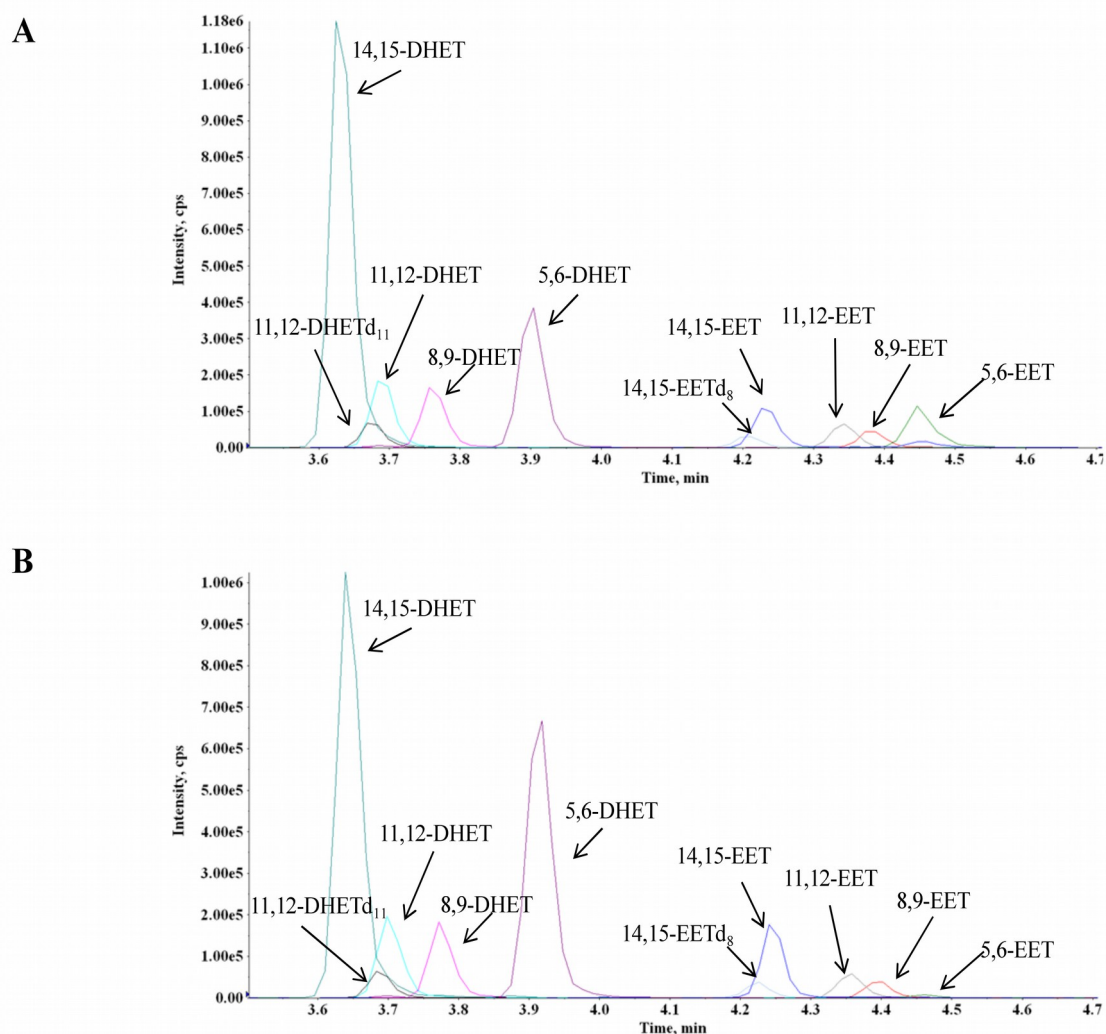


Figure 12: Chromatogramme obtenu par CLHP-SM/SM des EETs, DHETs et étalons internes deutérés dans le MeOH (A) et dans le NaCl 0.9% après traitement de l'échantillon (B).

Les essais de répétabilité ont mis en évidence un coefficient de variation (CV%) compris entre 1,8 et 13,2 % pour les CIQ bas, moyen et haut analysés en 6 réplicats (Tableau 5). La limite de quantification (LQ) des DHETs est de 0,25 ng/mL (Figure 13A) et celle des EETs est de 0,5 ng/mL (Figure 13B) avec un rapport signal sur bruit supérieur à 5 (Figure 14). Ces valeurs correspondent respectivement à des quantités de 15 et 30 pg sur la colonne chromatographique.

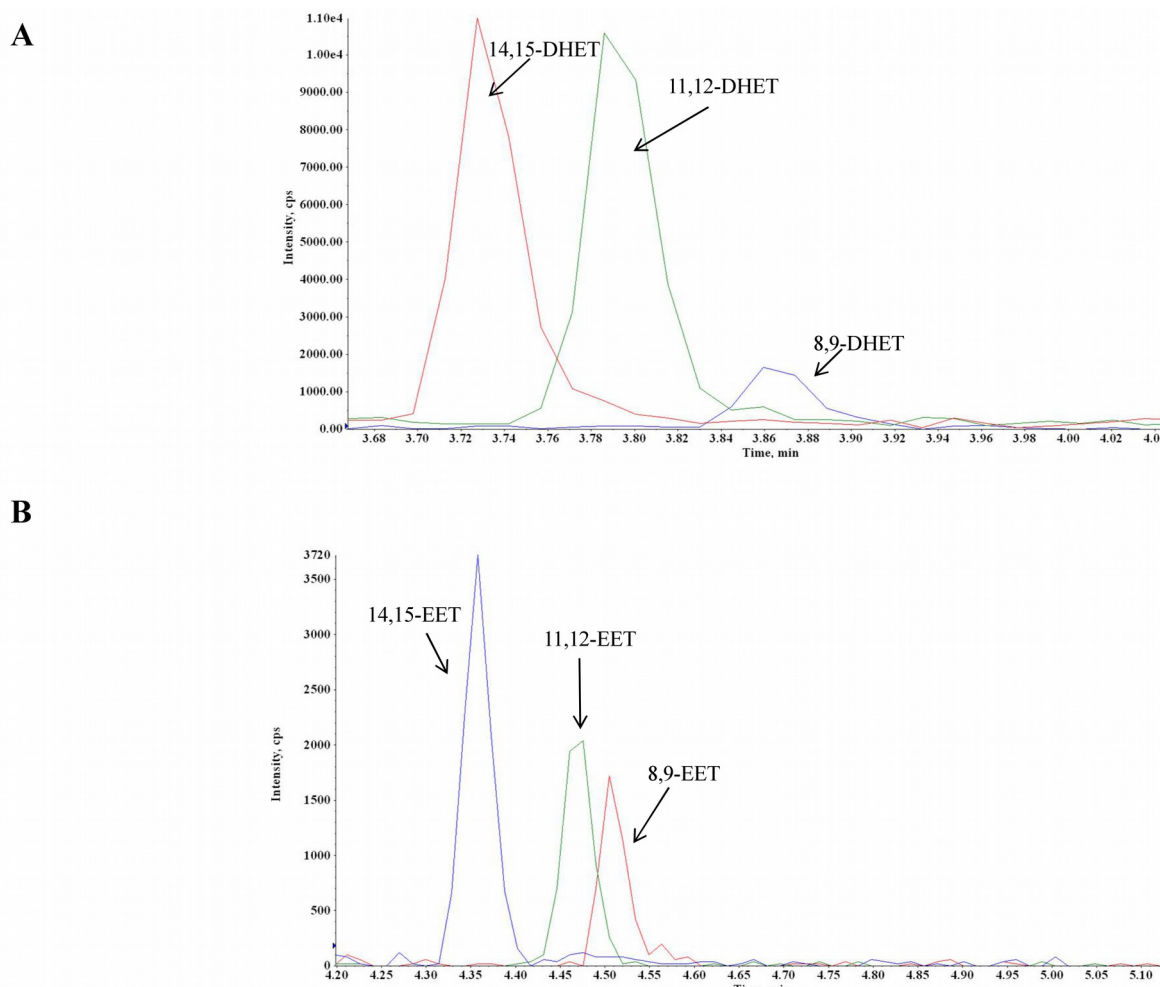


Figure 13 : Représentation des chromatogrammes à la limite de quantification à 0,25 ng/mL pour les DHETs (A) et à 0,5 ng/mL pour les EETs (B).

Les rendements d'extractions, les effets de matrice et l'efficacité du processus des différents composés sont résumés dans le Tableau 6, excepté pour le 5,6-EET et son métabolite, le 5,6-DHET. En effet, le rendement moyen du 5,6-EET est inférieur à 10%

tandis que celui du 5,6-DHET excède 100%, suggérant une conversion du 5,6-EET en 5,6-DHET au cours du traitement de l'échantillon qui empêche donc leur quantification.

Par ailleurs, la méthode possède un rendement d'extraction similaire entre les matrices NaCl et plasma allant de 60 à 84% pour les DHETs et de 56 à 72% pour les EETs, en incluant les étalons internes deutérés. Concernant les effets de matrice, il est intéressant de constater une augmentation importante du signal pour les DHETs dans le plasma (158-285%) que l'on ne retrouve pas dans la matrice NaCl (85-92%). Pour les EETs, un effet de suppression du signal est observé pour la matrice NaCl (65-90%) mais aussi pour la matrice plasma (60-94%). Ainsi, l'efficacité du processus est similaire pour les EETs dans la matrice NaCl (40-51%) et le plasma (50-60%). Concernant les DHETs, le PE est supérieur dans le plasma (119-214%) comparativement au NaCl (68-73%) mais ces différences sont compensées lorsque l'étalon interne deutéré est pris en compte dans le calcul du PE entre la matrice NaCl (117-126% pour les DHETs et 91% pour les EETs) et la matrice plasmatique (68-122% pour les DHETs et 85-101% pour les EETs). La pente et la linéarité des courbes de calibration pour chaque analyte dans les deux matrices sont présentées dans le tableau 7. La méthode que nous avons développée démontre une excellente linéarité de 0 à 20 ng/mL avec des valeurs de r^2 comprises entre 0,990 et 0,995 pour la matrice NaCl et entre 0,994 et 0,999 pour la matrice plasmatique. De plus, l'injection d'un échantillon blanc après 3 injections du CIQ haut n'a mis en évidence aucun effet de charge. Les données de stabilité des EETs et DHETs endogènes prélevés sur des tubes contenant différents anticoagulants sont regroupées dans le Tableau 8. Les tubes EDTA semblent être les mieux adaptés pour les cycles de congélation-décongélation et les stabilités à court et à long terme avec un recouvrement moyen compris entre 80 et 120 %.

Tableau 5 : Validation de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode.

	14,15- DHET	11,12- DHET	8,9- DHET	14,15- EET	11,12- EET	8,9- EET
Répétabilité						
CIQ Bas	0,75 ng/mL					
Moyenne	0,71	0,67	0,68	0,75	0,82	0,75
SD	0,05	0,03	0,03	0,01	0,03	0,01
CV (%)	6,9	4,8	3,9	1,8	3,8	1,8
CIQ Moyen	6 ng/mL					
Moyenne	5,87	5,94	5,45	6,01	6,02	6,25
SD	0,19	0,67	0,24	0,45	0,29	0,27
CV (%)	3,3	11,3	4,4	7,4	4,8	4,3
CIQ Haut	18 ng/mL					
Moyenne	17,32	17,44	16,65	18,40	18,28	18,46
SD	1,35	2,31	1,3	1,17	1,49	0,75
CV (%)	7,8	13,2	7,8	6,4	8,2	4
Reproductibilité						
LQ	0,25 ng/mL			0,5 ng/mL		
Moyenne	0,26	0,27	0,25	0,49	0,51	0,50
SD	0,03	0,02	0,02	0,05	0,05	0,04
CV (%)	10,2	6,2	9	9,4	9,8	7,6
CIQ Bas	0,75 ng/mL					
Moyenne	0,74	0,75	0,72	0,74	0,77	0,69
SD	0,05	0,02	0,04	0,07	0,07	0,03
CV (%)	7,4	6,2	5,4	8,8	9,3	4,2
CIQ Moyen	6 ng/mL					
Moyenne	5,70	5,92	5,81	5,78	5,51	5,85
SD	0,18	0,31	0,19	0,47	0,32	0,22
CV (%)	3,1	5,2	3,3	8,2	5,7	3,8
CIQ Haut	18 ng/mL					
Moyenne	17,55	17,71	17,58	18,23	17,33	17,89
SD	1,25	0,94	0,27	0,56	0,97	0,93
CV (%)	7,1	5,3	1,6	3,2	5,6	5,2

CIQ : contrôle interne de qualité, SD : écart-type, CV: coefficient de variation, LQ : limite de quantification.

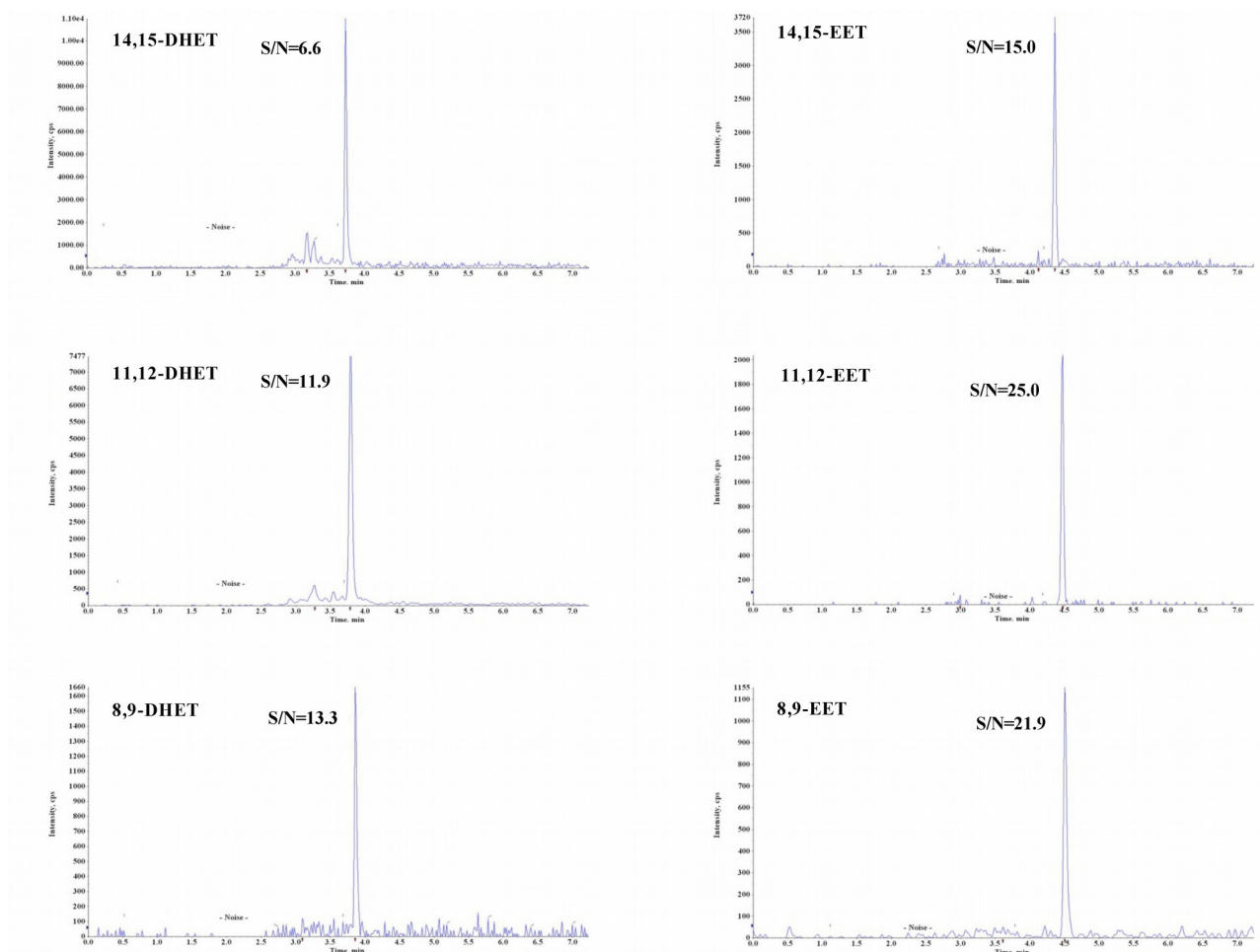


Figure 14 : Calcul du rapport signal / bruit à la limite de quantification de chaque composé.

4.2 Quantification des EETs et DHETs plasmatiques

Les EETs et DHETs plasmatiques ont été quantifiés à l'état basal et après stimulation de l'endothélium vasculaire chez 14 sujets sains et 5 hypertendus (tableau 9). Chez les volontaires sains, la concentration plasmatique en 8,9-EET est deux fois supérieure à celle du 14,15- et du 11,12-EET et le 8,9-DHET est le métabolite majoritaire suivi du 14,15-DHET et du 11,12-DHET. La stimulation de l'endothélium vasculaire par chauffage cutané distal a induit chez le sujet sain une augmentation similaire de tous les régioisomères d'EETs (Figure 15). Celle-ci est accompagnée d'une augmentation des différents DHETs plasmatiques. Par conséquent, la somme des EETs et des DHETs, pouvant être considérée comme un marqueur de la production d'EETs

par l'endothélium, s'accroît durant la stimulation endothéliale (de $23,4 \pm 8,1$ à $27,4 \pm 8,2$ ng/mL, $P < 0,01$), et l'amplitude de cette augmentation est positivement corrélée à l'amplitude de l'augmentation du débit sanguin ($r = 0,57$; $P=0,03$) (Figure 16).

Par ailleurs, étant donné que le 14,15-EET est le substrat préférentiel de la sEH, nous avons évalué l'activité de la sEH par le ratio 14,15-DHET/14,15-EET et observé une diminution durant le chauffage chez le volontaire sain (de $0,079 \pm 0,022$ à $0,073 \pm 0,021$, $P=0,04$). De ce fait, l'augmentation des concentrations en 14,15-DHET apparaît plus faible que celle du 11,12- et du 8,9- DHET ($P = 0,08$ pour chaque). Chez les patients hypertendus, caractérisés par une altération de la dilatation endothélium-dépendante en réponse à l'augmentation du débit sanguin (tableau 9), il n'y a pas de différence significative des concentrations plasmatiques en EETs et DHETs à l'état basal comparativement aux sujets sains. Cependant, nous observons une abolition complète de la libération d'EETs ou de DHETs au cours du chauffage (Figure 12). Enfin, le ratio 14,15-DHET / 14,15-EET, reflet de l'activité de la sEH, est plus important chez les patients hypertendus que chez les volontaires sains à l'état basal ($P < 0,05$) et ce ratio ne diminue pas au cours de la stimulation endothéliale chez les patients souffrant d'HTA (de $0,110 \pm 0,036$ à $0,107 \pm 0,030$, $P = 0,56$).

Tableau 6 : Rendement d'extraction, effet de matrice et efficacité du processus pour les EETs et les DHETs pour les échantillons dans le NaCl 0.9% et le plasma.

Analyte	Rendement d'extraction (%)		Effets de matrice (%)		Efficacité du processus (%)		Efficacité du processus de l'analyte (%) pondéré par celui de l'étalon interne deutéré	
	NaCl	Plasma	NaCl	Plasma	NaCl	Plasma	NaCl	Plasma
14,15-DHET	75 ± 5	76 ± 12	91 ± 9	285 ± 19	68 ± 7	214 ± 7	117 ± 6	122 ± 11
11,12-DHET	84 ± 15	84 ± 9	85 ± 12	207 ± 15	71 ± 6	165 ± 12	121 ± 7	98 ± 7
8,9-DHET	80 ± 4	75 ± 15	92 ± 7	158 ± 11	73 ± 5	119 ± 9	126 ± 13	68 ± 7
14,15-EET	62 ± 5	56 ± 7	75 ± 8	90 ± 11	46 ± 6	50 ± 6	91 ± 7	85 ± 9
11,12-EET	61 ± 6	57 ± 10	66 ± 6	89 ± 10	40 ± 5	51 ± 6	91 ± 8	99 ± 10
8,9-EET	63 ± 3	72 ± 8	65 ± 7	60 ± 8	41 ± 4	60 ± 8	91 ± 6	101 ± 10
11,12-DHETd11	60 ± 3	76 ± 5	98 ± 8	231 ± 34	59 ± 6	169 ± 19	-	-
14,15-EETd8	57 ± 3	64 ± 8	90 ± 10	94 ± 15	51 ± 5	59 ± 7	-	-

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de toutes les concentrations des courbes de calibration pour chaque analyte. n = 24 pour les DHETs et 21 pour les EETs dans chaque matrice.

Tableau 7 : Pentés correspondant au ratio de l'ASC de l'analyte sur celui de l'étalon interne pour chaque analyte préparé dans le méthanol (Groupe 1), dans le NaCl et le plasma enrichis après extraction (Groupe 2a et Groupe 2b respectivement) et avant extraction (Groupe 3a et Groupe 3b respectivement).

Analyte	Groupe 1	Groupe 2a	Groupe 2b	Groupe 3a	Groupe 3b
14,15-DHET	1,31 ± 0,08	1,28 ± 0,16	1,59 ± 0,21	1,59 ± 0,14	1,67 ± 0,06
	$r^2 = 0,999 \pm 0,002$	$r^2 = 0,998 \pm 0,001$	$r^2 = 0,997 \pm 0,004$	$r^2 = 0,994 \pm 0,004$	$r^2 = 0,994 \pm 0,006$
11,12-DHET	1,26 ± 0,10	1,18 ± 0,05	1,03 ± 0,15	1,59 ± 0,16	1,20 ± 0,07
	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$	$r^2 = 0,997 \pm 0,004$	$r^2 = 0,995 \pm 0,005$	$r^2 = 0,994 \pm 0,005$
8,9-DHET	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,15 ± 0,01
	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$	$r^2 = 0,996 \pm 0,005$	$r^2 = 0,997 \pm 0,004$	$r^2 = 0,995 \pm 0,005$	$r^2 = 0,994 \pm 0,005$
14,15-EET	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,02
	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$	$r^2 = 0,990 \pm 0,007$	$r^2 = 0,997 \pm 0,001$
11,12-EET	0,119 ± 0,005	0,106 ± 0,013	0,113 ± 0,005	0,108 ± 0,014	0,120 ± 0,002
	$r^2 = 0,996 \pm 0,006$	$r^2 = 0,996 \pm 0,003$	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$	$r^2 = 0,992 \pm 0,006$	$r^2 = 0,997 \pm 0,001$
8,9-EET	0,084 ± 0,001	0,080 ± 0,009	0,080 ± 0,003	0,085 ± 0,011	0,091 ± 0,003
	$r^2 = 0,997 \pm 0,002$	$r^2 = 0,997 \pm 0,004$	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$	$r^2 = 0,993 \pm 0,005$	$r^2 = 0,999 \pm 0,001$

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD. r^2 est le coefficient de détermination. n = 27 pour les DHETs et 24 pour les EETs dans chaque groupe.

Tableau 8 : *Tableau récapitulatif de l'étude de stabilité.*

Anti-coagulant		14,15- DHET	11,12- DHET	8,9- DHET	14,15- EET	11,12- EET	8,9- EET
Héparine	Concentration plasmatique	0,52 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,85 ± 0,06	3,93 ± 0,44	3,03 ± 0,44	7,17 ± 0,71
	48h autosampler	81,9 ± 5,6	79,9 ± 10,3	69,9 ± 16,5	104,9 ± 0,7	98,2 ± 8,1	96,8 ± 7,3
	3 cycles de FT	73,2 ± 3,0	91,4 ± 2,0	98,0 ± 6,8	87,4 ± 8,7	86,0 ± 7,5	87,5 ± 6,5
	Stabilité à 1 mois	90,3 ± 3,3	110,9 ± 2,9	93,0 ± 2,2	119,0 ± 7,1	103,0 ± 9,5	110,9 ± 3,6
EDTA	Concentration plasmatique	0,51 ± 0,04	0,33 ± 0,03	0,84 ± 0,09	4,90 ± 0,47	3,99 ± 0,41	8,27 ± 0,74
	48h autosampler	93,3 ± 2,1	92,2 ± 3,9	89,9 ± 8,5	101,8 ± 8,8	99,6 ± 5,1	97,7 ± 5,4
	3 cycles de FT	82,2 ± 6,9	80,8 ± 7,8	84,6 ± 7,2	92,2 ± 6,3	89,8 ± 4,3	98,2 ± 2,2
	Stabilité à 1 mois	99,3 ± 11,1	107,9 ± 6,4	102,2 ± 11,5	108,6 ± 13,2	95,0 ± 13,7	107,7 ± 11,3
Citrate de sodium	Concentration plasmatique	0,40 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,76 ± 0,03	4,67 ± 0,51	3,74 ± 0,61	7,63 ± 0,75
	48h autosampler	93,9 ± 11,8	88,8 ± 7,0	91,3 ± 1,8	99,0 ± 3,2	92,1 ± 5,6	99,9 ± 7,7
	3 cycles de FT	87,4 ± 4,4	76,0 ± 2,4	93,0 ± 20,1	68,5 ± 0,6	69,3 ± 5,7	78,4 ± 5,0
	Stabilité à 1 mois	99,1 ± 4,0	93,5 ± 7,3	86,4 ± 7,7	86,9 ± 3,1	78,0 ± 3,9	90,1 ± 5,8

Les concentrations plasmatiques sont exprimées en ng/mL ± SD, Le recouvrement des différents tests de stabilité est exprimé en pourcentage ± CV%. n = 3 pour chaque expérience. FT congélation-décongélation.

Tableau 9 : Données démographiques de la population.

Paramètres	Volontaires sains (n= 14)	Patients hypertendus (n= 5)
Age, années	45 ± 12	59 ± 12*
Homme (n, %)	9 (64%)	3 (60%)
Indice de masse corporelle, kg/m ²	25,0 ± 3,0	26,2 ± 1,2
Pression artérielle systolique humérale, mm Hg	126 ± 10	142 ± 14*
Pression artérielle diastolique humérale, mm Hg	75 ± 10	86 ± 5*
Fréquence cardiaque, bpm	60 ± 9	57 ± 8
Cholestérol total, g/L	1,74 ± 0,05	1,79 ± 0,02
Glycémie à jeun, g/L	0,89 ± 0,09	0,96 ± 0,07
Créatininémie, µmol/L	75 ± 11	74 ± 19
Diamètre de l'artère radiale à l'état basal, mm	2,36 ± 0,31	2,28 ± 0,15
Dilatation débit-dépendante, mm	0,45 ± 0,10	0,33 ± 0,12*
Flux sanguin de l'artère radiale à l'état basal, mL/min	7,5 ± 3,1	10,4 ± 6,0
Variation du flux sanguin, mL/min	54,9 ± 18,5	43,6 ± 16,9

Données exprimées en moyenne ± SD ou n (%). * $P < 0,05$ vs. volontaires sains.

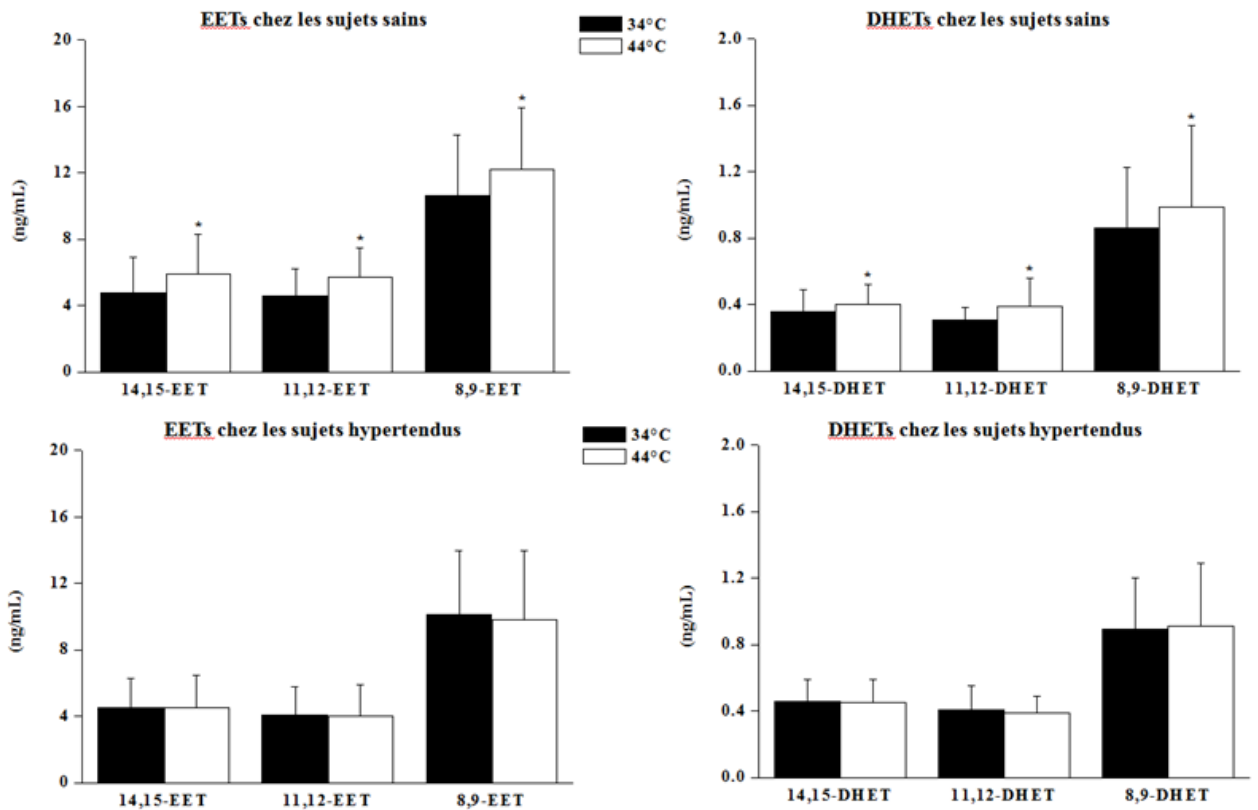


Figure 15 : Concentrations plasmatique en EETs et en DHETs à l'état basal (34°C) et pendant la stimulation endothéliale induite par chauffage cutané distal (44°C) chez les sujets sains (n=14) et chez les patients atteints d'HTA (n=5).

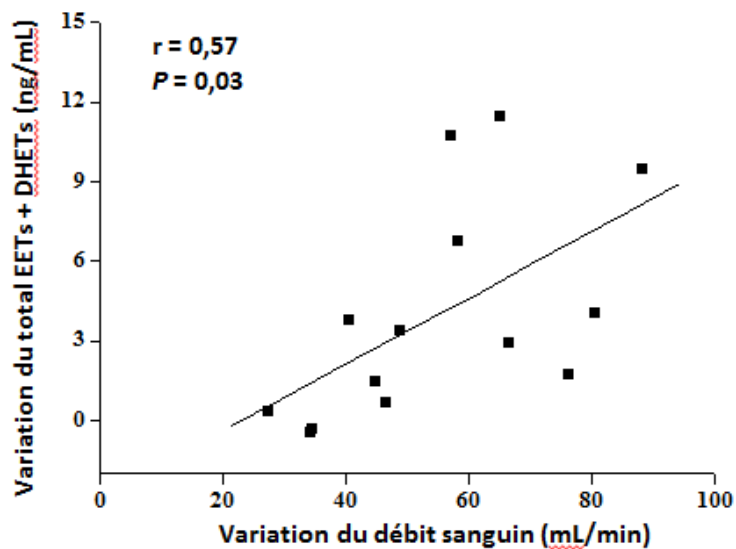


Figure 16 : Corrélation entre la variation du total EETs + DHETs et l'augmentation du débit sanguin lors du chauffage cutané distal chez les sujets sains (n=14).

5 Discussion

Une méthode rapide et reproductible a été développée et validée par CLHP-SM/SM permettant la quantification des différents régioisomères d'EETs et de DHETs dans le plasma humain. Nous avons pu mettre en évidence l'intérêt d'étudier cette voie en conditions physiologiques et physiopathologiques. Depuis plus de 20 ans, de nombreuses avancées ont été faites pour démontrer le rôle majeur des EETs dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire et métabolique chez l'homme *in vivo*. Les inhibiteurs spécifiques de la partie hydrolase de la sEH sont de plus en plus reconnus comme un outil pharmacologique prometteur pour le traitement de l'HTA et du DT2 (Bellien *et al.*, 2011; Duflot *et al.*, 2014; Morrissette et Hammock, 2013; Bellien *et al.*, 2012). Dans ce contexte, nous avons mis au point une méthode analytique permettant la quantification des EETs et de leurs métabolites dans le plasma. Cette méthode permet la détection des régioisomères d'EETs et de DHETs grâce à l'utilisation de transitions "ion père > ion fils" spécifiques de chaque composé, excepté le 5,6-EET. Celui-ci n'a pas pu être quantifié dans les échantillons saponifiés, un prérequis nécessaire à la libération de ces composés liés à des structures lipidiques complexes, du fait de son instabilité et de sa conversion en 5,6-DHET ou en dérivé lactone (Fulton *et al.*, 1998). Le caractère labile du 5,6-EET permet d'expliquer pourquoi le rendement du 5,6-EET est très faible et pourquoi celui du 5,6-DHET excède 100%. Cependant, l'absence de données relatives à ces composés dans cette étude a probablement un impact limité dans l'étude de la voie des EETs/DHETs puisque le 5,6-EET est le seul régioisomère connu pour être fortement métabolisé par la COX-2 afin d'exercer son activité biologique (Carroll *et al.*, 1990).

Nous avons tout d'abord validé la méthode analytique sur une matrice NaCl 0,9% après vérification de la répétabilité, de la reproductibilité, de la linéarité et d'une

LQ inférieure aux concentrations plasmatiques habituellement observées chez l'homme en EETs et en DHETs. En effet, il n'existe à l'heure actuelle aucune matrice biologique authentique dépourvue d'EETs et de DHETs pouvant être utilisée comme matrice vierge afin d'y ajouter les standards analytiques (Van de Merbel, 2008). Bien que le charbon activé soit un outil intéressant pour éliminer les AG libres du plasma, il ne permet en revanche pas d'enlever les EETs et DHETs liés aux lipoprotéines (Van de Merbel, 2008). Par ailleurs, nous aurions pu retirer les EETs et DHETs endogènes en passant une matrice biologique au travers d'une cartouche contenant des anticorps directement dirigés contre les EETs et les DHETs, mais cette technique s'avère coûteuse et chronophage (Van de Merbel, 2008). Ainsi, en utilisant les formules utilisées par Matuszewski *et al* (2003) pour la détermination du PE et les pentes des courbes de calibration, nous avons obtenus des résultats similaires pour les EETs sur la matrice NaCl et la matrice plasmatique après correction par les étalons internes deutérés.

Cependant, il est important de souligner que les différences obtenues pour le 8,9-DHET et le 11,12-DHET ne sont pas totalement compensées par l'étalon interne deutéré. Nous avons également étudié la stabilité des EETs et des DHETs dans le plasma et l'impact des principaux anticoagulants utilisés en pratique clinique. Il est en effet important de standardiser les pratiques concernant le mode de prélèvement et le traitement de l'échantillon car ces facteurs peuvent profondément influencer la quantification absolue des EETs et des DHETs.

Premièrement, le sang doit être prélevé dans un tube préalablement refroidi dans la glace, immédiatement centrifugé et congelé en accord avec des études antérieures soulignant la dégradation ou la formation d'EETs et de DHETs *ex vivo* (Goulitquer *et al.*, 2008; Willenberg *et al.*, 2015). Pour cette raison, nous n'avons pas validé notre méthode sur des prélèvements sur sérum avec lesquels un certain délai est nécessaire

pour permettre la coagulation complète de l'échantillon, pouvant interférer avec les résultats. Deuxièmement, certains facteurs inhérents au processus de saponification utilisé peuvent conduire à des différences dans la libération des AG liés comme par exemple la concentration de NaOH utilisée, la température, la durée de la saponification ou encore l'extraction préalable des lipides de l'échantillon primaire, et ces paramètres doivent faire l'objet d'une attention particulière (Schuchardt *et al.*, 2013; Schebb *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 1995; Levison *et al.*, 2013). Troisièmement, l'utilisation d'EETs et de DHETs deutérés est primordial pour quantifier ces eicosanoïdes dans le plasma par CLHP-SM/SM, car d'autres composés appartenant également à la cascade de l'ARA, les HETEs, possèdent le même ion père, des ions fils similaires à ceux des EETs et possèdent de plus un temps de rétention très proche de celui des EETs (Figure 17A) (Levinson *et al.* 2013). Il est important de noter qu'une analyse de l'extrait lipidique réalisée sans saponification révèle la présence de DHETs mais ne permet pas de quantifier les EETs présents à des concentrations inférieures à notre LQ (Figure 17B).

Ces résultats confirment le fait que les EETs libres représentent seulement une faible fraction de la totalité des EETs estimée aux alentours de 1%. Ainsi, de plus grands volumes de plasma sont nécessaires pour permettre leur détection et leur quantification (Zhu *et al.* 2011). Prenant en considération l'ensemble de ces aspects, nous avons pu démontrer une bonne stabilité des EETs et des DHETs dans le plasma, particulièrement lorsque le sang est prélevé sur un tube EDTA et que le plasma est immédiatement congelé et stocké à -80°C. Grâce au développement de cette méthode analytique, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois l'évolution des concentrations en EETs et DHETs au niveau local durant une stimulation endothéliale par chauffage cutané distal. Notre laboratoire avait précédemment mis en évidence une

augmentation des EETs totaux par une technique utilisant la GC-MS lors du chauffage contribuant à la vasodilatation débit-dépendante (Bellien *et al.* 2012).

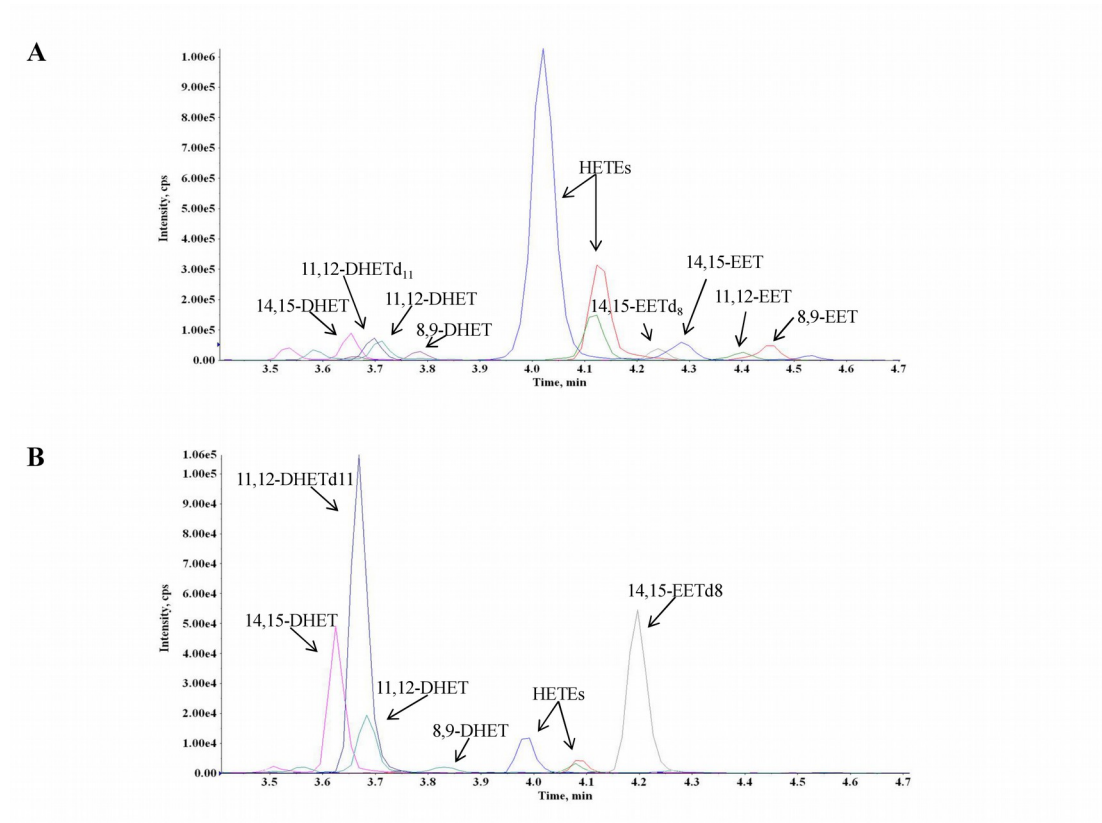


Figure 17 : Chromatogrammes représentant un échantillon plasmatique saponifié (A) et non saponifié (B)

Nous avons approfondi ces résultats en montrant une augmentation pour chaque régioisomère des EETs chez le volontaire sain au cours de la stimulation endothéliale. Ces résultats contrastent avec les résultats attendus en prenant en compte la régiosélectivité des CYP450 intervenant dans l'époxydation de l'ARA (Capdevila *et al.* 2000) et des résultats obtenus *ex vivo* suggérant que le 11,12-EET était le principal régioisomère libéré permettant la dilatation endothélium-dépendante des artères humaines (Archer *et al.*, 2003). De plus, nous avons démontré qu'une partie des EETs produits au cours de la stimulation est rapidement convertie en DHETs, renforçant l'intérêt d'étudier la somme EETs + DHETs comme un index de la production des EETs.

Par ailleurs, en accord avec un mécanisme de dilatation endothélium-dépendant, la production d'EETs s'accroît avec l'amplitude d'augmentation du flux sanguin au niveau de l'artère radiale.

Bien que ces résultats préliminaires nécessitent de plus amples investigations afin de garantir leur fiabilité, la diminution du ratio 14,15-DHET / 14,15-EET au cours du chauffage suggère que non seulement la stimulation endothéliale augmente la production d'EETs par les CYP450, mais qu'elle diminue également l'activité de la sEH intervenant dans leur dégradation. Dans ce contexte, nous avons observé chez les patients hypertendus et donc possédant une fonction endothéliale altérée, comme en témoigne la diminution de la dilatation débit-dépendante, une abolition complète de libération de tous les régioisomères d'EETs. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études chez des patients hypertendus non traités montrant que le taux total d'EETs quantifié par CG/SM n'augmente pas au cours du chauffage (Bellien *et al.* 2012). Dans ce travail, nous avons également démontré chez les patients atteints d'HTA une altération de la voie des EETs par deux mécanismes synergiques. D'une part, une augmentation de l'activité de la sEH représentée par le ratio 14,15-DHET / 14,15-EET, et d'autre part, une abolition de la production d'EETs comme en témoigne l'absence d'augmentation d'EETs et de DHETs au cours du chauffage comparativement aux volontaires sains. Cette absence de production d'EETs chez les patients HTA pourrait être liée à une diminution de l'expression des CYP450 époxygénases dans cette population comme cela a été montré sur le plan expérimental (Zhao *et al.*, 2003).

6 Perspectives

A partir de ce travail, trois grands axes de développement semblent intéressants à explorer. Le premier concerne le développement analytique, le second l'extension des explorations vasculaires à d'autres types de pathologies affectant le système cardiovasculaire et le troisième l'étude de la partie phosphatase de la sEH. En effet, le traitement de l'échantillon nécessaire à la quantification des EETs et DHETs peut être étendu à l'ensemble des lipides bioactifs. Nous avons traité dans ce travail uniquement les dérivés époxydes et diol de l'ARA. Cependant, nous avons vu précédemment qu'il existe également des dérivés époxydés d'autres acides gras tels que l'EPA, le DHA ou encore l'acide linoléique pouvant être convertis en diols (Figure 18) (Oni-Orisan *et al.*, 2014).

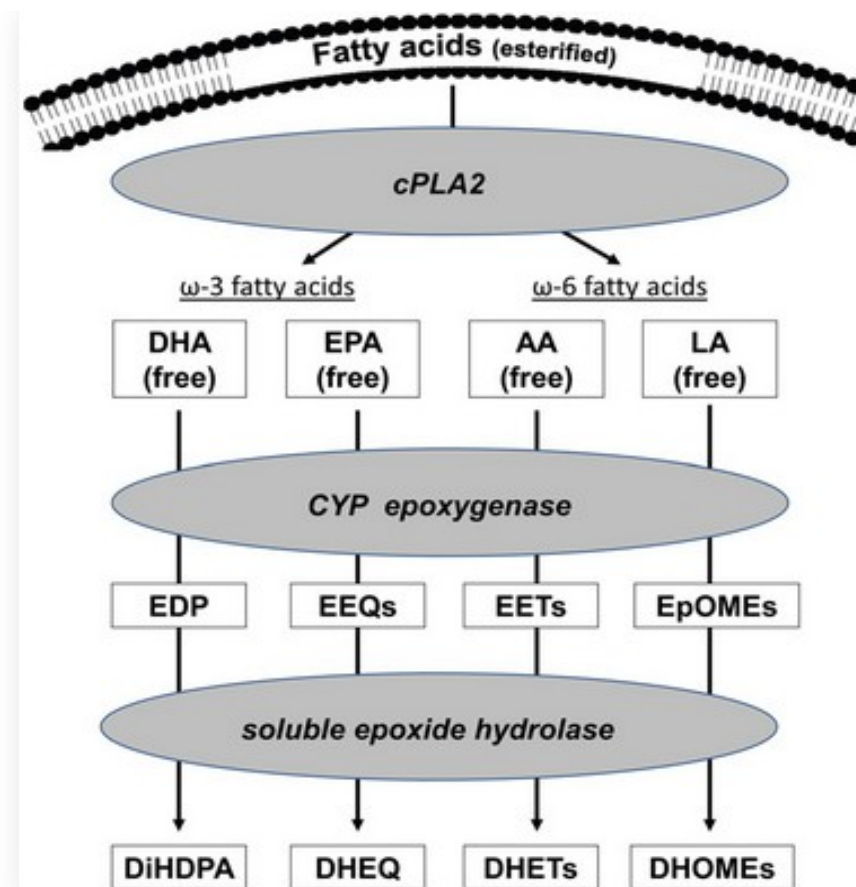


Figure 18 : Métabolisme des acides gras époxydés.

Ces composés possèdent également des propriétés physiologiques intéressantes sur le plan inflammatoire et vasculaire et leur quantification permettrait d'avoir une vision plus globale du rôle physiologique de la sEH et de son implication dans diverses pathologies (Askari *et al.*, 2014; Kunisawa *et al.*, 2015; Ulu *et al.*, 2014). D'autre part, la conversion de l'ARA en EETs ne concerne qu'une petite fraction de l'ARA circulant et la quantification d'un plus grand nombre de composés produits à partir de ce précurseur peut s'avérer particulièrement intéressante puisque certains de ces composés, notamment les HETEs, peuvent être le reflet de l'inflammation ou du stress oxydant. L'objectif à terme est d'obtenir un panel lipidique conséquent permettant la réalisation d'un screening lipidomique large potentiellement applicable dans de nombreuses pathologies faisant l'objet d'études cliniques (Figure 19 et 19B) (Astarita *et al.*, 2015).

A

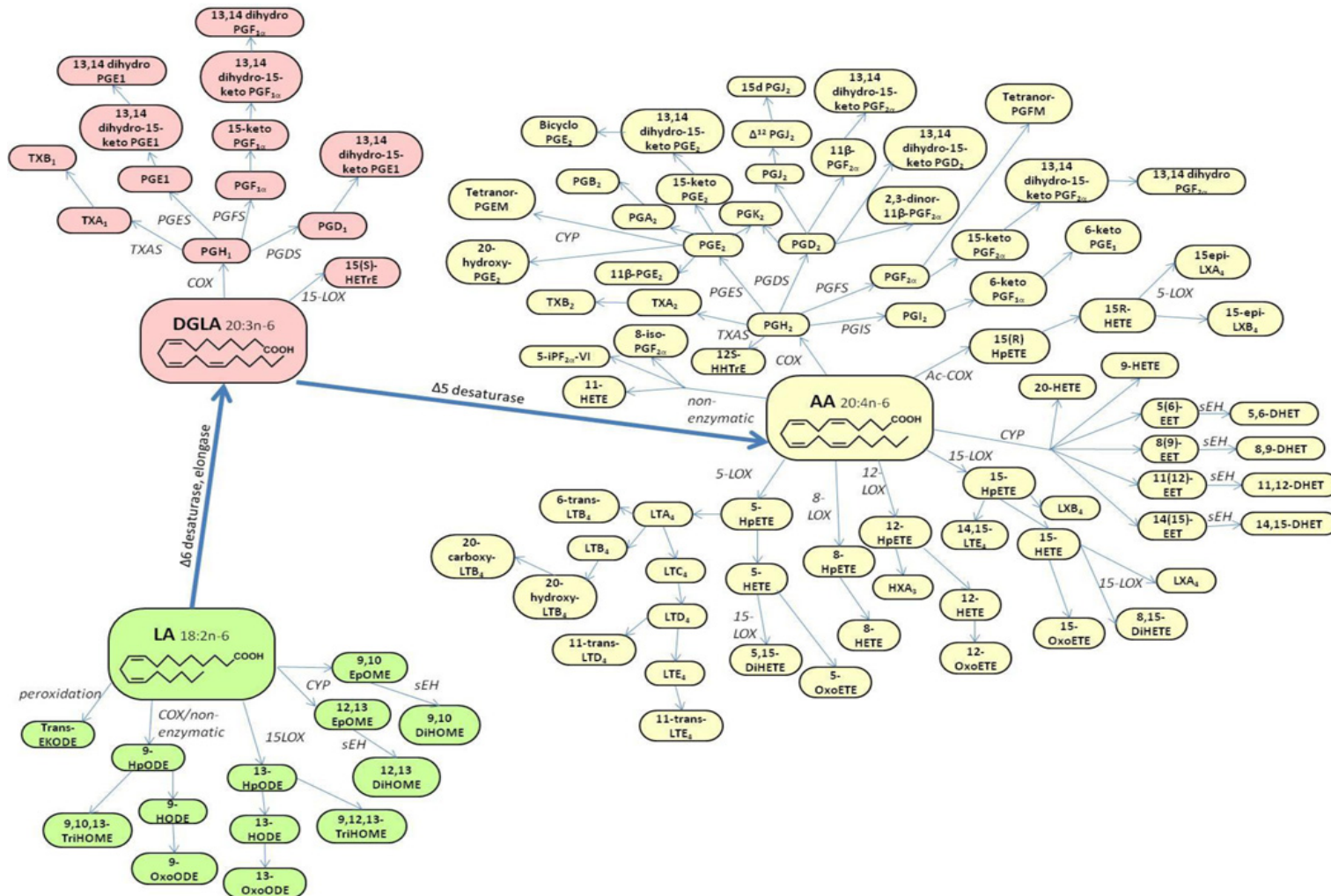


Figure 19 A : Cascades métaboliques de l'acide arachidonique (AA), de l'acide dihomo- γ -linoléique (DGLA) et de l'acide linoléique.

B

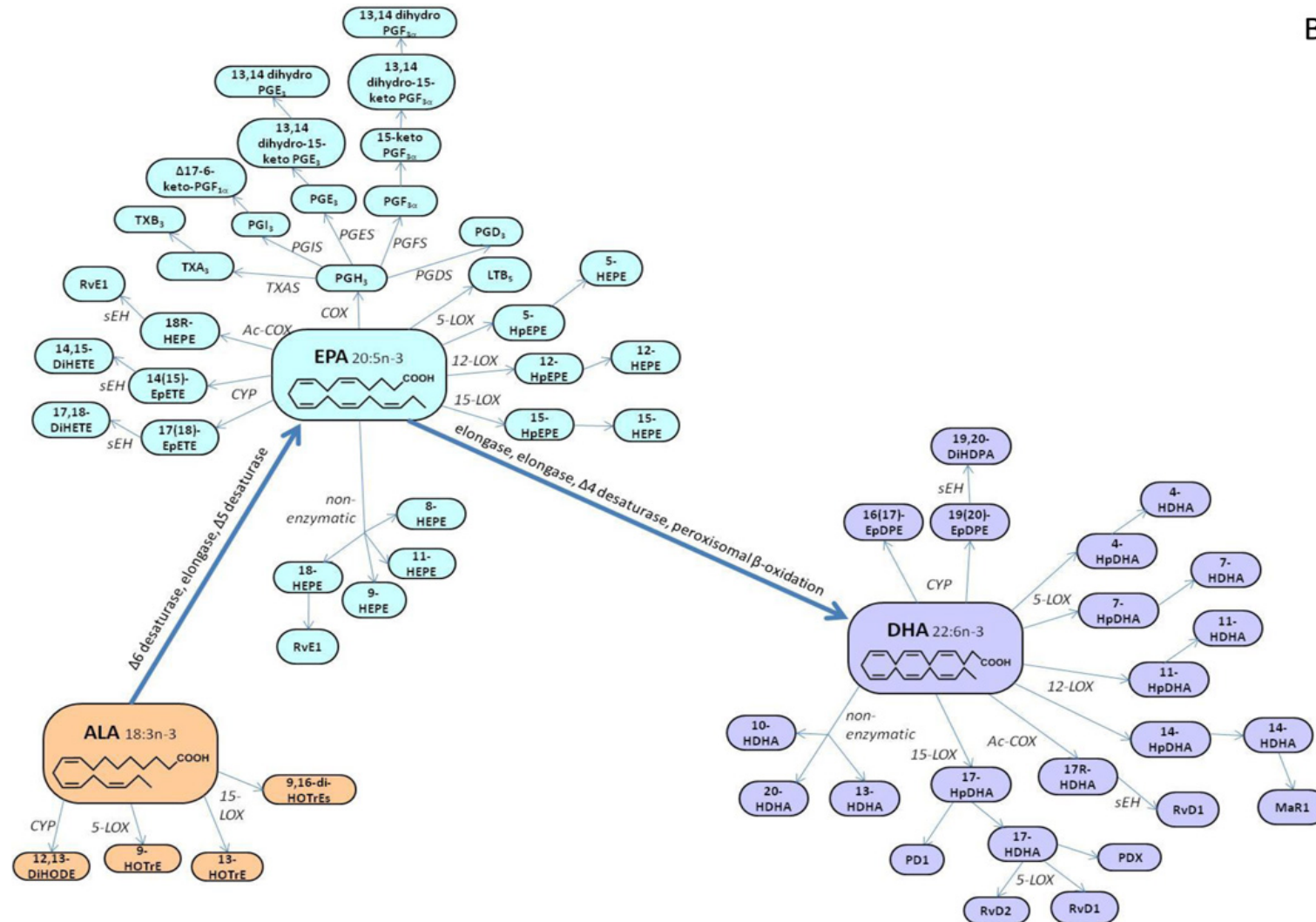


Figure 19 B : Cascades métaboliques de l'acide eicosapentaénoïque (EPA), de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide γ l-inoléniq.

Concernant les explorations vasculaires, la technique de chauffage utilisée pour stimuler l'endothélium vasculaire et les méthodes de mesure du débit sanguin et du diamètre de l'artère radiale sont d'excellents indicateurs de la fonction vasculaire. Bien que le nombre de sujets malades soit restreint pour cette étude qui ne concerne que des patients HTA, ces explorations vasculaires et analytiques peuvent être élargies à d'autres pathologies afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale. Des protocoles de recherche clinique sont actuellement en cours dans le DT2, l'insuffisance cardiaque associée ou non à l'hypertension pulmonaire et chez le patient transplanté. Enfin, une étude est actuellement en cours d'élaboration afin d'étudier la toxicité vasculaire des traitements anticancéreux.

Enfin, la partie phosphatase de la sEH n'a été à l'heure actuelle que très peu étudiée et devrait faire l'objet d'investigations scientifiques plus poussées. Elle pourrait en effet expliquer certaines divergences obtenues lors d'études utilisant un inhibiteur pharmacologique spécifique de la partie hydrolase comparativement à l'étude d'animaux *knock-out* pour la sEH et donc dépourvus de toute activité hydrolase et phosphatase, notamment au niveau pulmonaire. Par ailleurs, les substrats *in vivo* de la partie phosphatase n'ont toujours pas été clairement identifiés malgré certaines hypothèses concernant les précurseurs pyrophosphates du cholestérol et les LPA (Newman *et al.*, 2003; Cronin *et al.*, 2003; Morisseau *et al.*, 2012; Oguro *et al.*, 2012). L'hypothèse selon laquelle les phospholipides des membranes sont métabolisés par la PLA₂ afin de libérer les EETs pris en charge par la partie hydrolase de la sEH, et selon laquelle les LPA obtenus après action de la PLA₂ sont des substrats de la partie phosphatase permettant d'obtenir du 1-monoacylglycérol, semble tout à fait plausible bien que l'effet physiologique d'un tel métabolisme reste mal connu.

7 Conclusion

Nous avons mis au point et validé une méthode rapide et robuste pour la quantification simultanée des différents régioisomères d'EETs et de DHETs par CLHP-SM/SM dans le plasma, et démontré son intérêt pour l'étude de la fonction endothéliale chez l'homme. Plus particulièrement, nous avons démontré que les 8,9-, 11,12- et 14,15-EET sont tous libérés dans le même ordre de grandeur durant la stimulation endothéliale au niveau des artères de conductance périphériques chez le sujet sain, et que cette libération est abolie chez le patient HTA.

Ainsi, ces techniques exploratoires représentent une opportunité intéressante pour étudier le rôle des régioisomères d'EETs en physiologie humaine et en cas de pathologies cardiovasculaires. Enfin, bien que la quantification absolue du 8,9- et du 11,12-DHET ne soit pas réalisable du fait des effets de matrice qui ne sont pas totalement compensés par les étalons internes deutérés, cette méthode pourra être appliquée pour monitorer l'impact thérapeutique des nouveaux inhibiteurs de la sEH développés, en utilisant le ratio 14,15-DHET / 14,15-EET. En effet, il existe dorénavant des inhibiteurs pharmacologiques de la sEH de nouvelle génération possédant des propriétés physico-chimiques et une formulation galénique favorables à son administration par voie orale. De nombreuses études expérimentales ont maintenant démontré les effets bénéfiques de ces inhibiteurs dans diverses pathologies (hypertension, diabète, maladies inflammatoires). Des essais cliniques comportant un inhibiteur de la sEH ont été débutés afin d'évaluer la sécurité et l'intérêt de ces composés dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires chez l'homme, avec comme objectif de réduire significativement la morbi-mortalité liée à ces maladies.

8 Références

1. Ai D., Fu Y., Guo D., Tanaka H., Wang N., Tang C., *et al.* (2007). Angiotensin II up-regulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9018–23
2. Alonso-Galicia M., Falck J.R., Reddy K.M., Roman R.J. (1999) 20-HETE agonists and antagonists in the renal circulation. *Am J Physiol*, 277, 790–796.
3. Arand M., Wagner H., Oesch F. (1996). Asp333, Asp495, and His523 form the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase. *J Biol Chem*, 271, 4223–9
4. Archer S.L., Gragasin F.S., Wu X., Wang S., McMurtry S., Kim D.H., *et al.* (2003). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation*, 107, 169-76.
5. [Argiriadi M.A.](#), [Morisseau C.](#), [Goodrow M.H.](#), [Dowdy D.L.](#), [Hammock B.D.](#), [Christianson D.W.](#) (2000). Binding of alkylurea inhibitors to epoxide hydrolase implicates active site tyrosines in substrate activation. *J Biol Chem*, 275, 15265–70
6. Askari A.A., Thomson S., Edin M.L., Lih F.B., Zeldin D.C., Bishop-Bailey D. (2014). Basal and inducible anti-inflammatory epoxygenase activity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 446, 633-7.
7. Astarita G., Kendall A.C., Dennis E.A., Nicolaou A. (2015). Targeted lipidomics strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1851, 456-68.
8. Beetham J.K., Tian T., Hammock B.D. (1993). cDNA cloning and expression of a soluble epoxide hydrolase from human liver. *Arch Biochem Biophys*, 305, 197–201

9. Bellien J., Iacob M., Remy-Jouet I., Lucas D., Monteil C., Gutierrez L., *et al* (2012). Epoxyeicosatrienoic acids contribute with altered NO and endothelin-1 pathways to conduit artery endothelial dysfunction in essential hypertension. *Circulation*, 125, 1266-1275.
10. Bellien J., Joannides R., Richard V., Thuillez C. (2011). Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol Ther*, 131,1-17.
11. Bellien J., Joannidès R., Iacob M., Arnaud P., Thuillez C. (2006). Evidence for a basal release of a cytochrome-related endothelium-derived hyperpolarizing factor in the radial artery in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, 1347-52.
12. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J., Meyer E.F. Jr., Brice M.D., Rodgers J.R., *et al.* (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol*, 112, 535-42.
13. Bligh E.G., Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-7.
14. Burdon K.P., Lehtinen A.B., Langefeld C.D., Carr J.J., Rich S.S., Freedman B.I., *et al.* (2008). Genetic analysis of the soluble epoxide hydrolase gene, EPHX2, in subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. *Diabetes Vasc Dis Res Off J Int Soc Diabetes Vasc Dis*, 5, 128–34.
15. Capdevila J.H., Falck J.R., Harris R.C. (2000) Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res*, 41, 163-81.

16. Carroll M.A., Garcia M.P., Falck J.R., McGiff J.C. (1990). 5,6-epoxyeicosatrienoic acid, a novel arachidonate metabolite. Mechanism of vasoactivity in the rat. *Circ Res.* 67, 1082-8.
17. [Chaudhary K.R.](#), [Abukhashim M.](#), [Hwang S.H.](#), [Hammock B.D.](#), [Seubert J.M.](#) (2010). Inhibition of soluble epoxide hydrolase by trans-4- [4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoic acid is protective against ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 55, 67–73.
18. Chen D., Whitcomb R., MacIntyre E., Tran V., Do Z.N., Sabry J., *et al.* (2012). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of AR9281, an inhibitor of soluble epoxyde hydrolase, in single- and multiple-dose studies in healthy human subjects. *J Clin Pharmacol.* 52, 319-28.
19. [Chen L.](#), [Fan C.](#), [Zhang Y.](#), [Bakri M.](#), [Dong H.](#), [Morisseau C.](#), *et al.* (2013). Beneficial effects of inhibition of soluble epoxide hydrolase on glucose homeostasis and islet damage in a streptozotocin-induced diabetic mouse model. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 104-105, 42–8.
20. Cronin A., Mowbray S., Dürk H., Homburg S., Fleming I., Fisslthaler B., *et al.* (2003). The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1552–7.
21. Daikh B.E., Lasker J.M., Raucy J.L., Koop D.R. (1994) Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9. *J Pharmacol Exp Ther*, 271, 1427–33.
22. De Taeye B.M., Morisseau C., Coyle J., Covington J.W., Luria A., Yang J., *et al.* (2010). Expression and regulation of soluble epoxide hydrolase in adipose tissue. *Obes Silver Spring Md*, 18, 489–98

23. Decker M., Arand M., Cronin A. (2009). Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol*, 83, 297–318.
24. Dietze E.C., Kuwano E., Casas J., Hammock B.D. (1991). Inhibition of cytosolic epoxide hydrolase by trans-3-phenylglycidols. *Biochem Pharmacol*, 42, 1163–75.
25. Dufлот T., Roche C., Lamoureux F., Guerrot D., Bellien J. (2014). Design and discovery of soluble epoxide hydrolase inhibitors for the treatment of cardiovascular diseases. *Expert Opin Drug Discov*, 9, 229-243.
26. Dufлот T., Pereira T., Roche C., Iacob M., Cardinael P., Hamza N.E., *et al.* (2017). A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of regioisomers of epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids in human plasma during endothelial stimulation. *Anal Bioanal Chem*, 409, 1845-55.
27. [Elmarakby A.A.](#), [Faulkner J.](#), [Al-Shabrawey M.](#), [Wang M.H.](#), [Maddipati K.R.](#), [Imig J.D.](#) (2011). Deletion of soluble epoxide hydrolase gene improves renal endothelial function and reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301, R1307–1317.
28. Enayetallah A.E., Grant D.F. (2006). Effects of human soluble epoxide hydrolase polymorphisms on isoprenoid phosphate hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 341, 254–60
29. Enayetallah A.E., Luria A., Luo B., Tsai H.J., Sura P., Hammock B.D. *et al.* (2008). Opposite regulation of cholesterol levels by the phosphatase and hydrolase domains of soluble epoxide hydrolase. *J Biol Chem*, 283, 36592–8.
30. [Fakhr I.M.](#), [Radwan M.A.](#), [el-Batran S.](#), [Abd el-Salam O.M.](#), [el-Shenawy S.M.](#) (2009). Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted

- benzo[b]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. *Eur J Med Chem*, 44, 1718–25.
31. Falck J.R., Manna S., Moltz J., Chacos N., Capdevila J. (1983). Epoxyeicosatrienoic acids stimulate glucagon and insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*, 114, 743–9
32. Fang X., VanRollins M., Kaduce T.L., Spector A.A. (1995). Epoxyeicosatrienoic acid metabolism in arterial smooth muscle cells. *J Lipid Res*, 36, 1236-46.
33. [Fang X.](#), [Weintraub N.L.](#), [Spector A.A.](#) (2003). Differences in positional esterification of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid in phosphatidylcholine of porcine coronary artery endothelial and smooth muscle cells. [*Prostaglandins Other Lipid Mediat*](#), 71, 33-42.
34. Fornage M., Boerwinkle E., Doris P.A., Jacobs D., Liu K., Wong N.D. (2004). Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circulation*, 109, 335–9.
35. Fulton D., Falck J.R., McGiff J.C., Carroll M.A., Quilley J. (1998). A method for the determination of 5,6-EET using the lactone as an intermediate in the formation of the diol. *J Lipid Res*, 39, 1713-21.
36. Gao J., Bellien J., Gomez E., Henry J.P., Dautreaux B., Bounoure F., *et al.* (2011). Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents coronary endothelial dysfunction in mice with renovascular hypertension. *J Hypertens*, 29, 1128–35
37. Giannarelli C., Viridis A., De Negri F., Magagna A., Duranti E., Salvetti A., *et al.* (2009). Effect of sulfaphenazole on tissue pregeinogen activator release in normotensive subjects and hypertensive patients. *Circulation*, 119, 1625–33.

38. [Gierse J.](#), [Thorarensen A.](#), [Beltey K.](#), [Bradshaw-Pierce E.](#), [Cortes-Burgos L.](#), [Hall T.](#), *et al.* (2010). A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 334, 310-7.
39. Gomez G.A., Morisseau C., Hammock B.D., Christianson D.W. (2004). Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis. *Biochemistry (Mosc)*, 43, 4716–23.
40. [Goullitquer S.](#), [Dréano Y.](#), [Berthou F.](#), [Corcos L.](#), [Lucas D.](#) (2008). Determination of epoxyeicosatrienoic acids in human red blood cells and plasma by GC/MS in the NICI mode. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 876, 83-88.
41. [Gschwendtner A.](#), [Ripke S.](#), [Freilinger T.](#), [Lichtner P.](#), [Müller-Myhsok B.](#), [Wichmann H.E.](#), *et al.* (2008). Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) is associated with an increased risk of ischemic stroke in white Europeans. *Stroke J Cereb Circ*, 39, 1593–6.
42. Hercule H.C., Schunck W.H., Gross V., Seringer J., Leung F.P., Weldon S.M., *et al.* (2009). Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 54–60.
43. Imig J.D. (2005b). Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, F496–503.
44. Imig J.D. (2012). Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiol Rev*, 92, 101–30.

45. Imig J.D., Zhao X., Capdevila J.H., Morisseau C., Hammock B.D. (2002). Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. *Hypertension*, 39, 690–4
46. [Imig J.D.](#), [Zhao X.](#), [Zaharis C.Z.](#), [Olearczyk J.J.](#), [Pollock D.M.](#), [Newman J.W.](#), *et al.* (2005). An orally active epoxide hydrolase inhibitor lowers blood pressure and provides renal protection in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 46, 975–81.
47. Jiang H., Quilley J., Reddy L.M., *et al.* (2005) Red blood cells: reservoirs of cis- and trans-epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 75, 65–78
48. Joannidès R., Costentin A., Iacob M., Compagnon P., Lahary A., Thuillez C. (2002). Influence of vascular dimension on gender difference in flow-dependent dilatation of peripheral conduit arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282, H1262-9.
49. [Jung O.](#), [Jansen F.](#), [Mieth A.](#), [Barbosa-Sicard E.](#), [Pliquett R.U.](#), [Babelova A.](#), *et al.* (2010). Inhibition of the soluble epoxide hydrolase promotes albuminuria in mice with progressive renal disease. *PloS One*, 5, e11979
50. Karara A., Dishman E., Falck J.R., Capdevila J.H. (1991) Endogenous epoxyeicosatrienoyl-phospholipids. *J Biol Chem*, 266, 7561-7569.
51. Karara A., Wei S., Spady D., Swift L., Capdevila J.H., Falck J.R. (1992). Arachidonic acid epoxygenase: Structural characterization and quantification of epoxyeicosatrienoates in plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, 182, 1320-1325.
52. Keserü B., Barbosa-Sicard E., Schermuly R.T., Tanaka H., Hammock B.D., Weissmann N., *et al.* (2010). Hypoxia-induced pulmonary hypertension:

- comparison of soluble epoxide hydrolase deletion vs. inhibition. *Cardiovasc Res*, 85, 232-40
53. Kim I.H., Heirtzler F.R., Morisseau C., Nishi K., Tsai H.J., Hammock B.D. (2005). Optimization of amide-based inhibitors of soluble epoxide hydrolase with improved water solubility. *J Med Chem*, 48, 3621–9.
54. Kim I.H., Morisseau C., Watanabe T., Hammock B.D. (2004). Design, synthesis, and biological activity of 1,3-disubstituted ureas as potent inhibitors of the soluble epoxide hydrolase of increased water solubility. *J Med Chem*, 47, 2110–22.
55. Klett E.L., Chen S., Yechoor A., Lih F.B., Coleman R.A. (2017). Long-chain acyl-CoA synthetase isoforms differ in preferences for eicosanoid species and long-chain fatty acids. *J Lipid Res*, [Epub Ahead of print].
56. Kunisawa J., Arita M., Hayasaka T., Harada T., Iwamoto R., Nagasawa R., et al. (2015). Dietary ω 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep*, 5, 9750.
57. Lazaar L., Yang L., Boardley R.L., Goyal N.S., Robertson J., Baldwin S.J., et al. (2016). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse event profile of GSK2256294, a novel soluble epoxide hydrolase inhibitor. *Br J Clin Pharmacol*. 81, 971-9.
58. Lee C.R., North K.E., Bray M.S., Fornage M., Seubert J.M., Newman J.W., et al. (2006). Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Hum Mol Genet*, 15, 1640–9

59. Lee C.R., Pretorius M., Schuck R.N., Burch L.H., Bartlett J., Williams S.M., *et al.* (2011). Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) is associated with forearm vasodilator responses in humans. *Hypertension*, 57, 116–22.
60. Lee S.H., Lee J., Cha R., Park M.H., Ha J.W., Kim S., *et al.* (2008). Genetic variations in soluble epoxide hydrolase and graft function in kidney transplantation. *Transplant Proc*, 40, 1353–6
61. Levison B.S., Zhang R., Wang Z., Fu X., DiDonato J.A., Hazen S.L. (2013). Quantification of fatty acid oxidation products using online high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Free Radic Biol Med*, 59, 2-13.
62. Lin M.E., Herr D.R., Chun J. (2013). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 91, 130-8.
63. [Liu J.Y.](#), [Lin Y.P.](#), [Qiu H.](#), [Morisseau C.](#), [Rose T.E.](#), [Hwang S.H.](#), *et al.* (2013). Substituted phenyl groups improve the pharmacokinetic profile and anti-inflammatory effect of urea-based soluble epoxide hydrolase inhibitors in murine models. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*, 48, 619–27.
64. Liu Y., Zhang Y., Schmelzer K., *et al.* (2005) The antiinflammatory effect of laminar flow: the role of PPARgamma, epoxyeicosatrienoic acids, and soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16747–52.
65. Loch D., Hoey A., Morisseau C., Hammock B.D., Brown L. (2007). Prevention of hypertension in DOCA-salt rats by an inhibitor of soluble epoxide hydrolase. *Cell Biochem Biophys*, 47, 87–98.

66. Loot A.E., Fleming I. (2011). Cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids and pulmonary hypertension: central role of transient receptor potential C6 channels. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57, 140–7.
67. Luo P., Chang H.H., Zhou Y., Zhang S., Hwang S.H., Morisseau C., et al. (2010). Inhibition or deletion of soluble epoxide hydrolase prevents hyperglycemia, promotes insulin secretion, and reduces islet apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 334, 430–8.
68. Luria A., Bettaieb A., Xi Y., Shieh G.J., Liu H.C., Inoue H., et al. (2011). Soluble epoxide hydrolase deficiency alters pancreatic islet size and improves glucose homeostasis in a model of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9038–43.
69. Luria A., Morisseau C., Tsai H.J., et al. (2009). Alteration in plasma testosterone levels in male mice lacking soluble epoxide hydrolase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E375–383.
70. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*, 75, 3019-30.
71. Minuz P., Jiang H., Fava C., Turolo L., Tacconelli S., Ricci M., et al. (2008). Altered release of cytochrome p450 metabolites of arachidonic acid in renovascular disease. *Hypertension*, 51, 1379–85.
72. Moffat M.P., Ward C.A., Bend J.R., Mock T., Farhangkhoe P., Karmazyn M. (1993). Effects of epoxyeicosatrienoic acids on isolated hearts and ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 264, H1154–1160.

73. Monti J., Fischer J., Paskas S., Heinig M., Schulz H., Gösele C., *et al.* (2008). Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease. *Nat Genet*, 40, 529–37.
74. Morisseau C., Du G., Newman J.W., Hammock B.D. (1998). Mechanism of mammalian soluble epoxide hydrolase inhibition by chalcone oxide derivatives. *Arch Biochem Biophys*, 356, 214–28.
75. Morisseau C., Goodrow M.H., Dowdy D., Zheng J., Greene J.F., Sanborn J.R., *et al.* (1999). Potent urea and carbamate inhibitors of soluble epoxide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8849–54.
76. Morisseau C., Goodrow M.H., Newman J.W., Wheelock C.E., Dowdy D.L., Hammock B.D. (2002). Structural refinement of inhibitors of urea-based soluble epoxide hydrolases. *Biochem Pharmacol*, 63, 1599–608.
77. Morisseau C., Hammock B.D. (2013). Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 37-58.
78. Morisseau C., Inceoglu B., Schmelzer K., Tsai H.J., Jinks S.L. Hegedus C.M. *et al.* (2010). Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids. *J Lipid Res*, 51, 3481–90
79. [Morisseau C.](#), [Pakhomova S.](#), [Hwang S.H.](#), [Newcomer M.E.](#), [Hammock B.D.](#) (2013b). Inhibition of soluble epoxide hydrolase by fulvestrant and sulfoxides. *Bioorg Med Chem Lett*, 23, 3818–21.
80. Morisseau C., Schebb N.H., Dong H., Ulu A., Aronov P.A. Hammock B.D. (2012). Role of soluble epoxide hydrolase phosphatase activity in the metabolism of lysophosphatidic acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 419, 796–800

81. [Motoki A.](#), [Merkel M.J.](#), [Packwood W.H.](#), [Cao Z.](#), [Liu L.](#), [Iloff J.](#), *et al.* (2008). Soluble epoxide hydrolase inhibition and gene deletion are protective against myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H2128–2134.
82. Nelson J.W., Subrahmanyam R.M., Summers S.A., Xiao X., Alkayed N.J. (2013). Soluble epoxide hydrolase dimerization is required for hydrolase activity. *J Biol Chem*, 288, 7697–703
83. Newman J.W., Morisseau C., Harris T.R., Hammock B.D. (2003). The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 100, 1558–63.
84. Node K., Huo Y., Ruan X., Yang B., Spiecker M., Ley K., *et al.* (1999). Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*, 285, 1276–9.
85. Node K., Ruan X.L., Dai J., Yang S.X., Graham L., Zeldin D.C., *et al.* (2001). Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem*, 276, 15983–9.
86. Oguro A., Imaoka S. (2012). Lysophosphatidic acid are new substrates for the phosphatase domain of soluble epoxide hydrolase. *J Lipid Res*, 53, 505-12.
87. Ohtoshi K., Kaneto H., Node K., Nakamura Y., Shiraiwa T., Matsuhisa M., *et al.* (2005). Association of soluble epoxide hydrolase gene polymorphism with insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Biochem Biophys Res Commun*, 331, 347–50
88. [Olearczyk J.J.](#), [Quigley J.E.](#), [Mitchell B.C.](#), [Yamamoto T.](#), [Kim I.H.](#), [Newman J.W.](#), *et al.* (2009). Administration of a substituted adamantyl urea inhibitor of

- soluble epoxide hydrolase protects the kidney from damage in hypertensive Goto-Kakizaki rats. *Clin Sci Lond*, 116, 61–70.
89. Oni-Orisan A., Alsaleh N., Lee C.R., Seubert J.M. (2014). Epoxyeicosatrienoic acids and cardioprotection: the road to translation. *J Mol Cell Cardiol*, 74, 199-208.
90. Przybyla-Zawislak B.D., Srivastava P.K., Vazquez-Matias J., Mohrenweiser H.W., Maxwell J.E., Hammock B.D., *et al.* (2003). Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase. *Mol Pharmacol*, 64, 482–90.
91. Roche C., Guerrot D., Harouki N., DufLOT T., Besnier M., Remy-Jouet I., *et al.* (2015). Impact of soluble epoxyde hydrolase inhibition on early kidney damage in hyperglycemic overweight mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 120, 148-54.
92. [Sato K.](#), [Emi M.](#), [Ezura Y.](#), [Fujita Y.](#), [Takada D.](#), [Ishigami T.](#), *et al.* (2004). Soluble epoxide hydrolase variant (Glu287Arg) modifies plasma total cholesterol and triglyceride phenotype in familial hypercholesterolemia: intrafamilial association study in an eight-generation hyperlipidemic kindred. *J Hum Genet*, 49, 29–34.
93. Schebb N.H., Ostermann A.I., Yang J., Hammock B.D., Hahn A., Schuchardt J.P. (2014). Comparison of the effects of long-chain omega-3 fatty acid supplementation on plasma levels of free and esterified oxylipins. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 113-5, 21-9.
94. [Schmelzer K.R.](#), [Kubala L.](#), [Newman J.W.](#), [Kim I.H.](#), [Eiserich J.P.](#), [Hammock B.D.](#) (2005). Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9772–7.

95. [Schuchardt J.P.](#), [Schmidt S.](#), [Kressel G.](#), [Dong H.](#), [Willenberg I.](#), [Hammock B.D.](#), *et al.* (2013). Comparison of free serum oxylipin concentrations in hyper- vs. normolipidemic men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 89, 19-29.
96. Sinal C.J., Miyata M., Tohkin M., Nagata K., Bend J.R., Gonzalez F.J. (2000). Targeted disruption of soluble epoxide hydrolase reveals a role in blood pressure regulation. *J Biol Chem*, 275, 40504–10
97. Skepner J.E., Shelly L.D., Ji C., Reidich B., Luo Y. (2011). Chronic treatment with epoxyeicosatrienoic acids modulates insulin signaling and prevents insulin resistance in hepatocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 94, 3–8
98. Smyth S.S., Cheng H.Y., Miriyala S., Panchatcharam M., Morris A.J. (2008). Roles of lysophosphatidic acid in cardiovascular physiology and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1781, 563-70.
99. Srivastava P.K., Sharma V.K., Kalonia D.S., Grant D.F. (2004). Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase: effects on enzyme activity, enzyme stability, and quaternary structure. *Arch Biochem Biophys*, 427, 164–9.
100. Sun J., Sui X., Bradbury J.A., Zeldin D.C., Conte M.S., Liao J.K. (2002). Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Circ Res*, 90, 1020–7.
101. Sura P., Sura R., Enayetallah A.E., Grant D.F. (2008). Distribution and expression of soluble epoxide hydrolase in human brain. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*, 56, 551–9.
102. [Swaney J.S.](#), [Chapman C.](#), [Correa L.D.](#), [Stebbins K.J.](#), [Bundey R.A.](#), [Prodanovich P.C.](#), *et al.* (2010). A novel, orally active LPA1 receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *Br J Pharmacol*. 2010;160:1699-713

103. [Tang L.](#), [Ma W.H.](#), [Ma Y.L.](#), [Ban S.R.](#), [Feng X.E.](#), [Li Q.S.](#) (2013). Synthesis and biological activity of 4-substituted benzoxazolone derivatives as a new class of sEH inhibitors with high anti-inflammatory activity in vivo. *Bioorg Med Chem Lett*, 23, 2380–3.
104. [Tran K.L.](#), [Aronov P.A.](#), [Tanaka H.](#), [Newman J.W.](#), [Hammock B.D.](#), [Morisseau C.](#) (2005). Lipid sulfates and sulfonates are allosteric competitive inhibitors of the N-terminal phosphatase activity of the mammalian soluble epoxide hydrolase. *Biochemistry*, 44, 12179-87.
105. [Tsikas D.](#), [Zoerner A.A.](#) (2014). Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: a historical retrospect and a discussion. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 964, 79-88.
106. Ulu A., Harris T.R, Morisseau C., Miyabe C., Inoue H., Schuster G. *et al.* (2013). Anti-inflammatory effects of ω -3 polyunsaturated fatty acids and soluble epoxide hydrolase inhibitors in angiotensin-II-dependent hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 62, 285–97.
107. Ulu A., Lee K.S.S., Miyabe C., Yang J., Hammock B.G., Dong H., Hammock B.D. (2014). An omega-3 epoxide of docosahexaenoic acid lowers blood pressure in angiotensin-II dependant hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 64, 87-99.
108. Van de Merbel N.C. (2008). Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *Trends Anal Chem*, 27, 924-33.
109. Watanabe T., Morisseau C., Newman J.W., Hammock B.D. (2003). In vitro metabolism of the mammalian soluble epoxide hydrolase inhibitor, 1-cyclohexyl-3-dodecyl-urea. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*, 31, 846–53.

110. Webler A.C., Michaelis U.R., Popp R., Barbosa-Sicard E., Murugan A., Falck J.R., *et al.* (2008). Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, 1292–1301.
111. Willenberg I., Ostermann A.I., Schebb N.H. (2015). Targeted metabolomics of the arachidonic acid cascade: current state and challenge of LC-MS analysis of oxylipins. *Anal Bioanal Chem*, 407, 2675-83.
112. Xiao Y.F. (2007). Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac L-type Ca²⁺ and transient outward K⁺ channel activities by epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 82, 11–8.
113. Yu Z., Xu F., Huse L.M., Morisseau C., Draper A.J., Newman J.W. *et al.* (2000). Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res*, 87, 992–8
114. Yung YC, Stoddard NC, Chun J. (2014). LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res*, 55, 1192-214.
115. [Zhang L.N.](#), [Vincelette J.](#), [Chen D.](#), [Gless R.D.](#), [Anandan S.K.](#), [Rubanyi G.M.](#), *et al.* (2011). Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates endothelial dysfunction in animal models of diabetes, obesity and hypertension. *Eur J Pharmacol*, 654, 68–74.
116. Zhang W., Iliff J.J., Campbell C.J., Wang R.K., Hurn P.D., Alkayed N.J. (2009). Role of soluble epoxide hydrolase in the sex-specific vascular response to cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*, 29, 1475–81

117. Zhao X., Pollock D.M., Inscho E.W., Zeldin D.C., Imig J.D. (2003). Decreased renal cytochrome P450 2C enzymes and impaired vasodilation are associated with angiotensin salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 41, 709-14.
118. Zhao X., Yamamoto T., Newman J.W., Kim I.H., Watanabe T., Hammock B.D. et al. (2004). Soluble epoxide hydrolase inhibition protects the kidney from hypertension-induced damage. *J Am Soc Nephrol*, 15, 1244–53
119. Zhu P., Peck B., Licea-Perez H., Calahan J.F., Booth-Genthe C. (2011). Development of a semi-automated LC/MS/MS method for the simultaneous quantitation of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid, 14,15-dihydroxyeicosatrienoic acid, leukotoxin and leukotoxin diol in human plasma as biomarkers of soluble epoxide hydrolase activity in vivo. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879, 2487-93.
120. Zordoky B.N.M., El-Kadi A.O.S. (2010). Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*, 125, 446–63.

SERMENT DE GALIEN

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

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

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

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



DUFLOT Thomas

Mise au point, validation et application clinique d'une technique analytique du dosage des acides époxyeicosatriénoïques et dihydroxyeicosatriénoïques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Th. D. Pharm., Rouen, 2017, 105 p.

RESUME : Les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) sont des médiateurs lipidiques vasodilatateurs métabolisés par l'époxyde hydrolase soluble (sEH) en acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHETs). Nous avons développé une méthode analytique permettant leur quantification dans des prélèvements plasmatiques humains avant et après stimulation endothéliale. 14 volontaires sains et 5 volontaires hypertendus ont été prélevés avant et après stimulation endothéliale par chauffage cutané distal induisant une dilatation débit-dépendante de l'artère radiale. Les lipides du plasma ont été extraits par une méthode de Bligh et Dyer en milieu acide et saponifiés afin de libérer les EETs et DHETs estérifiés aux phospholipides. Une seconde extraction liquide-liquide est réalisée afin de concentrer l'échantillon et les échantillons sont injectés dans le système après reconstitution dans du méthanol. Nous sommes parvenus grâce à cette méthode à quantifier les 8,9-, 11,12-, 14,15-EET, 8,9-, 11,12- et 14,15-DHET. Le 5,6-EET, dû à son instabilité chimique n'a pas pu être détecté dans les échantillons. La limite de quantification est de 0,25 ng/mL pour les DHETs et de 0,50 ng/mL pour les EETs. L'étude de la répétabilité et de la reproductibilité a permis de mettre en évidence des coefficients de variations entre 1,6 et 13,2 %. Le chauffage cutané distal induit une augmentation similaire des concentrations plasmatiques des différents régioisomères d'EETs et de DHETs chez les volontaires sains mais pas chez les patients hypertendus. Nous avons ainsi validé une technique analytique du dosage des EETs et des DHETs dans le plasma humain et démontré son intérêt dans l'étude de la fonction endothéliale.

MOTS CLES : Epoxyde hydrolase soluble - CLHP-SM/SM - Cellules endothéliales - Biologie vasculaire - Acides époxyeicosatriénoïques

JURY

Président : Mr BELLIEJN Jérémy, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Membres : Mr LAMOUREUX Fabien, Praticien Hospitalier

Mr JOANNIDES Robinson, Praticien Hospitalier

Mme EL GHARBI-HAMZA Najla, Maître de Conférences des Universités

Mr. DUKIC Sylvain, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

DATE DE SOUTENANCE : 20 Octobre 2017