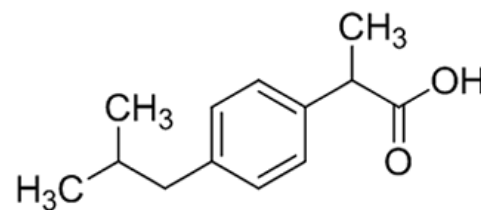
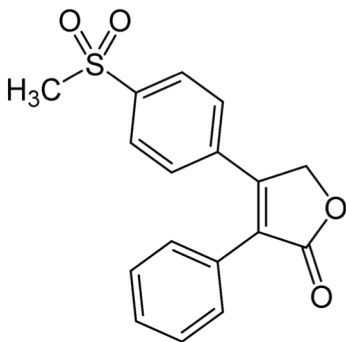
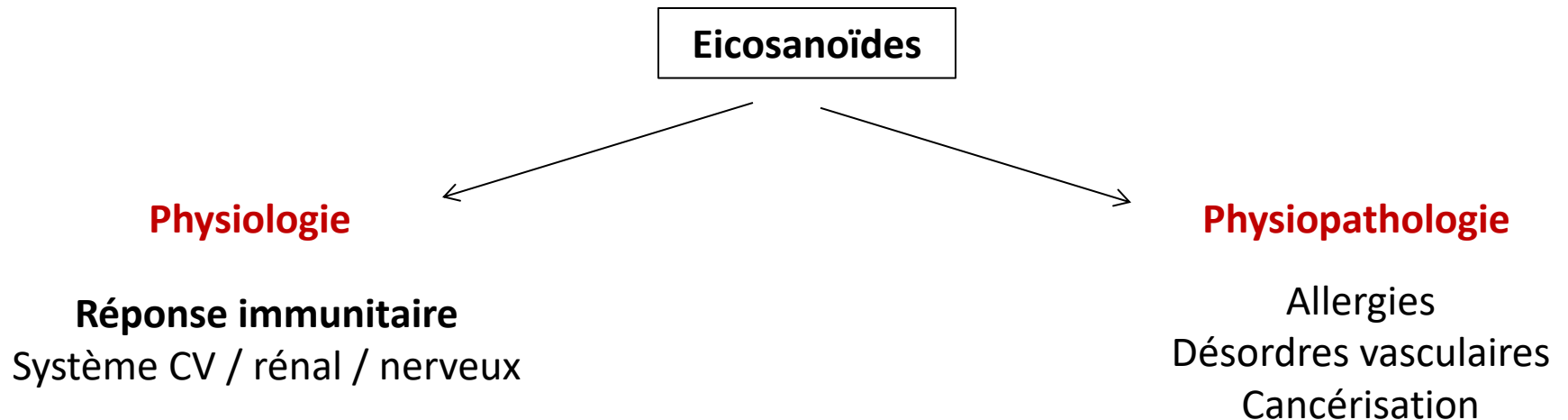


Mise en place d'une méthodologie analytique **basée sur l'HPTLC** pour l'étude des médiateurs lipidiques bioactifs



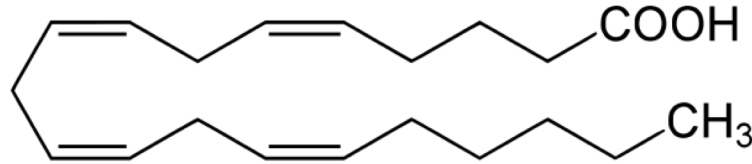
●●● *Médiateurs lipidiques bioactifs : Les Eicosanoïdes*

- Lipides capables de moduler de nombreuses activités cellulaires
- **Eicosa** = 20 carbones
- Issus pour la plupart de la métabolisation de l'**acide arachidonique = AA**
- Activité biologique contrôlée par des **récepteurs membranaires**
- Demi-vie de **courte** durée



●●● Acide Arachidonique

Généralités



- Acide gras **polyinsaturé** (4 doubles liaisons)
- 20 carbones – **C20:4**
- Généralement en **position 2** des glycérophospholipides
- Acide gras **essentiel** (œufs, gras de viande)
- Acide arachidonique = Acide eicosatétraénoïque = **ETA**
- Autre source d'eicosanoïdes = Acide eicosapentaénoïque = **EPA**

Acide Arachidonique, EPA: voie de synthèse

AA ($\omega 6$) :

Provient de la métabolisation de l'acide linoléique $\omega 6$ =

Acide gras indispensable (huile de tournesol, pépins de raisin, onagre)

EPA ($\omega 3$) :

Métabolisation de l'acide linoléique $\omega 3$ =

Huiles végétales (colza, soja, noix) et huiles de poissons (saumon, thon, hareng...)

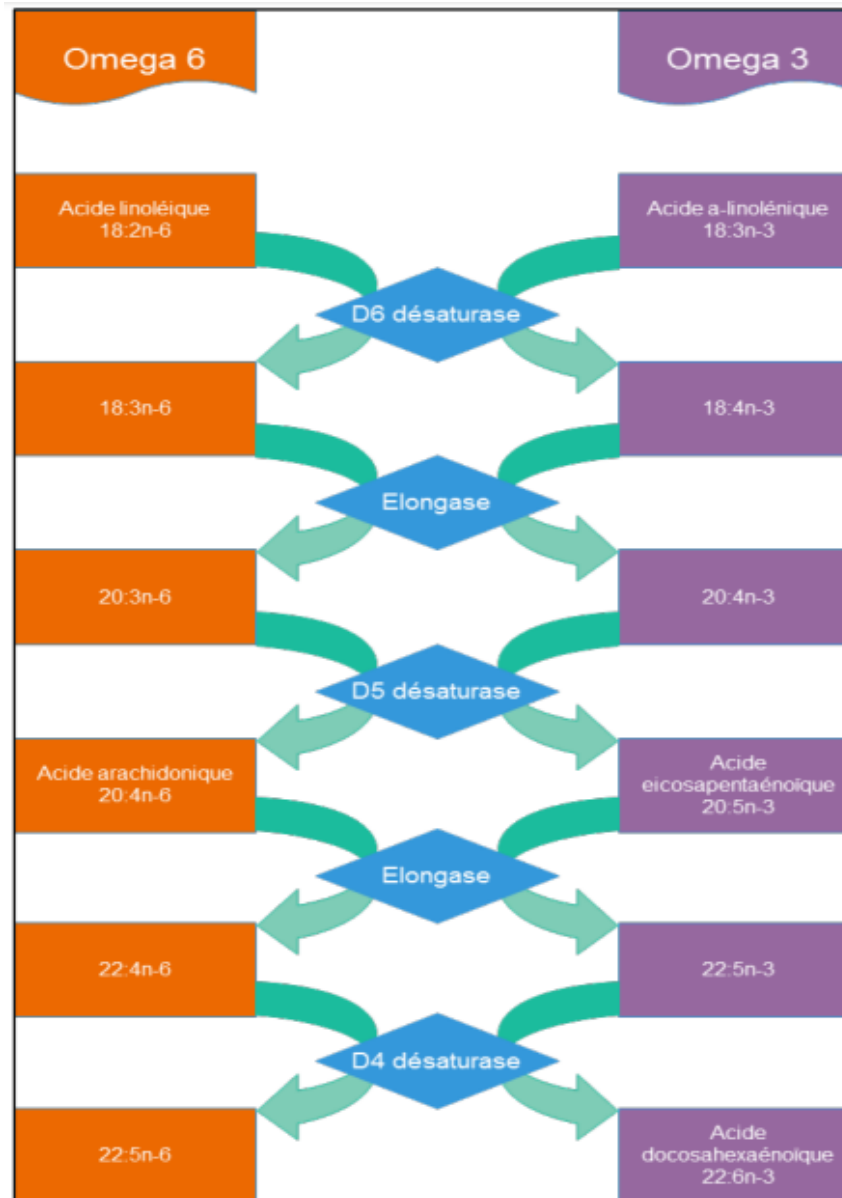
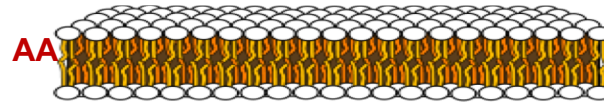


Figure 4 : Voies de synthèse des oméga-3 et des oméga-6

●●● Acide Arachidonique



Membrane cellulaire cytoplasmique

Les Phospholipases A2

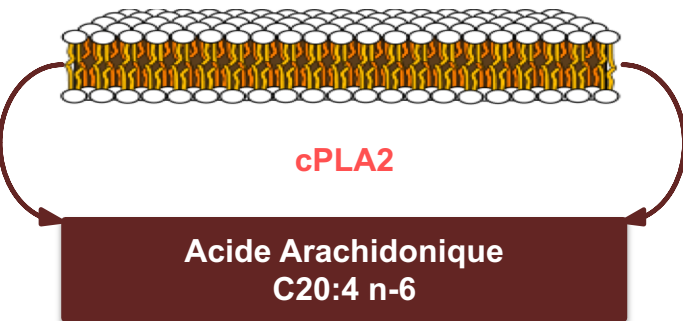
4 grandes catégories : différences structures, pH optimum, dépendance au Ca^{2+} , localisation, spécificité substrat, susceptibilité à l'inhibition pharmacologique

La cPLA2 (cytosolic, Ca^{2+} -dependent)

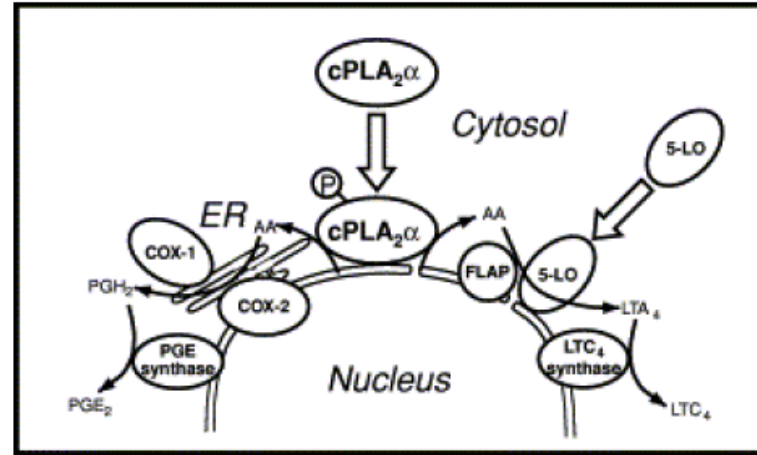
- Forte **sélectivité** pour les GPL contenant **l'acide arachidonique**, donc production de la plupart des eicosanoïdes
- Activée par stimuli conduisant à **l'augmentation du calcium intracellulaire** et à **l'activation de kinases** (cytokines, hormones, stress, oxydation, UV...)

Acide Arachidonique

La cPLA2 (cytosolic, Ca²⁺-dependent)



AA libéré



Hirabayashi T and Shimizu T, BBA (2000)

Cyclooxygénases (COX)

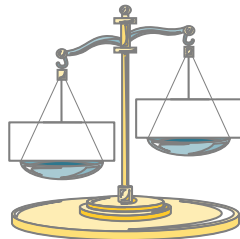
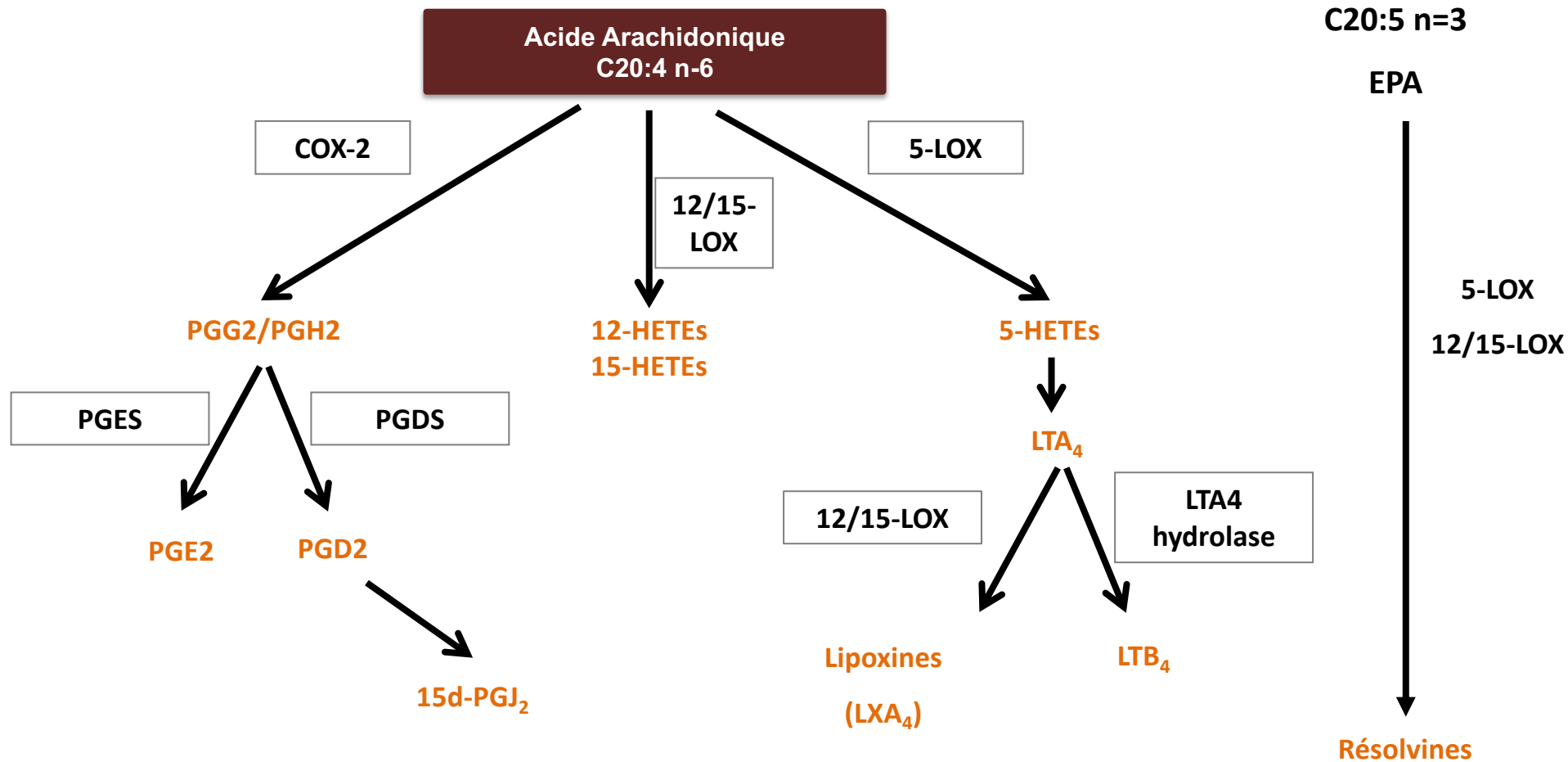
Lipoxygénases (LOX)

Cytochrome p450 monoxygénases (CYP450)

Eicosanoïdes produits : signalisation extracellulaire autocrine/paracrine (récepteurs),
signalisation intracellulaire (PPARs)



Les Eicosanoïdes : génération

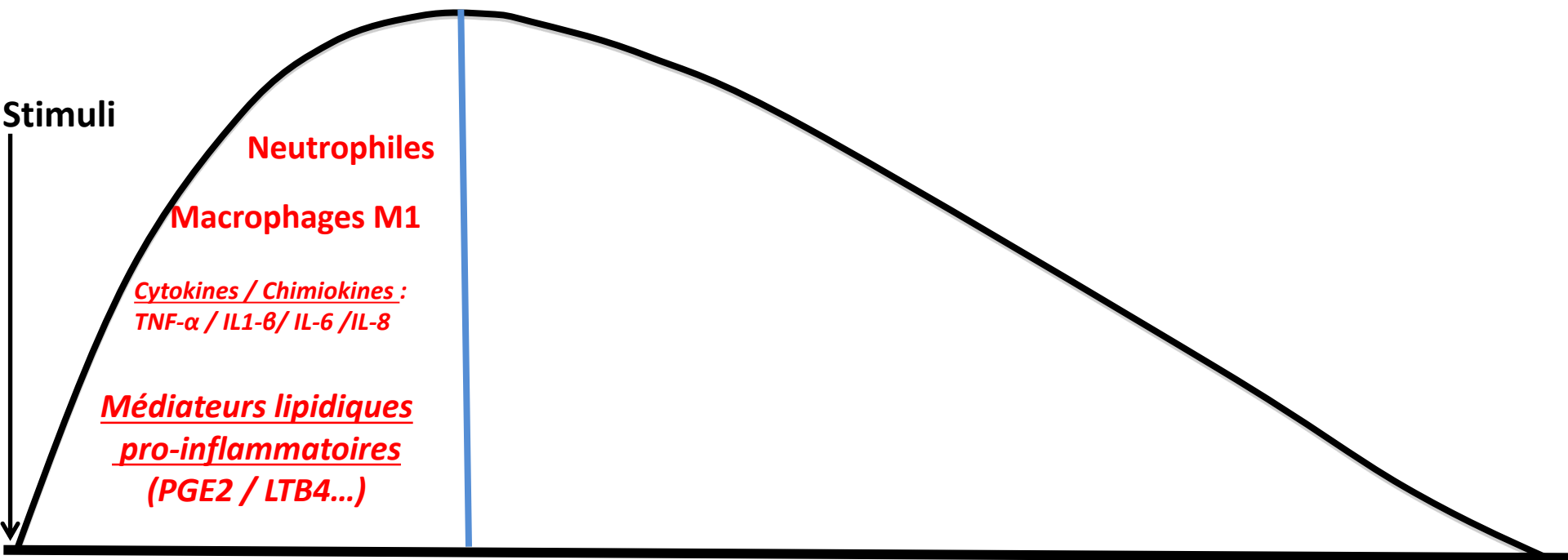


Pro-inflammatoire

Anti-inflammatoire

Les Eicosanoïdes : Rôle dans l'inflammation

Phase inflammatoire



COX-1/COX-2

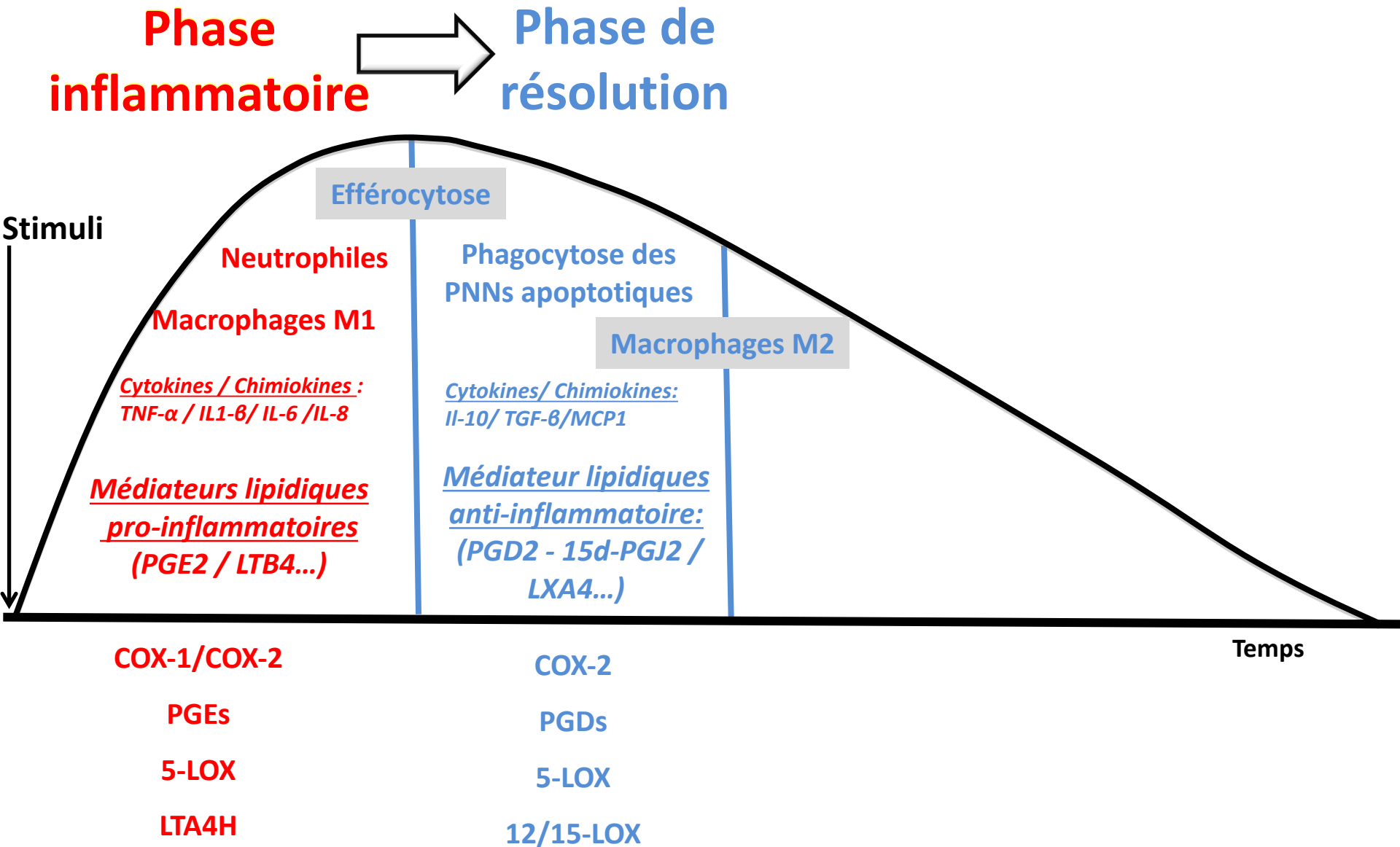
PGEs

5-LOX

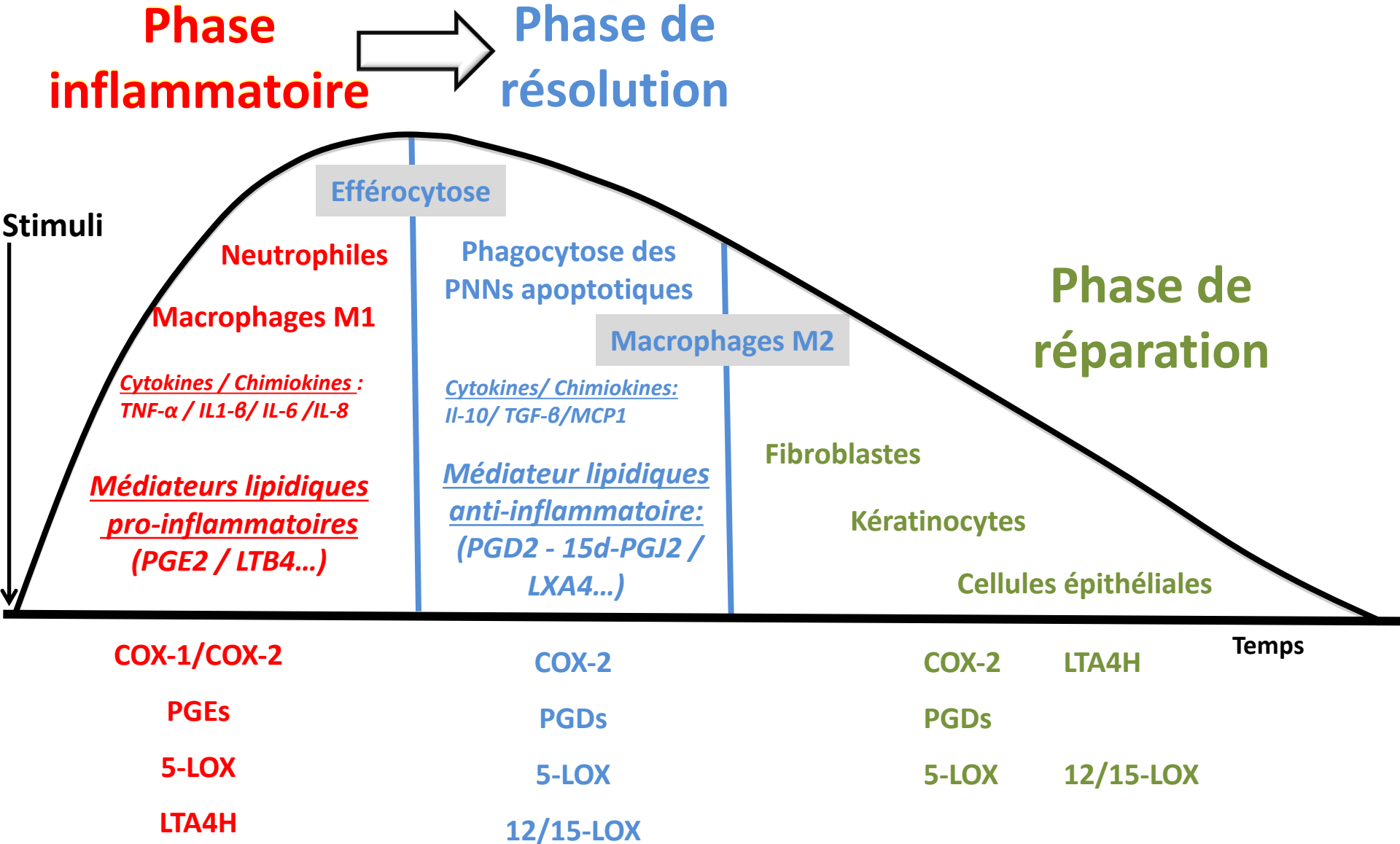
LTA4H

Temps

Les Eicosanoïdes : Rôle dans l'inflammation



Les Eicosanoïdes : Rôle dans l'inflammation



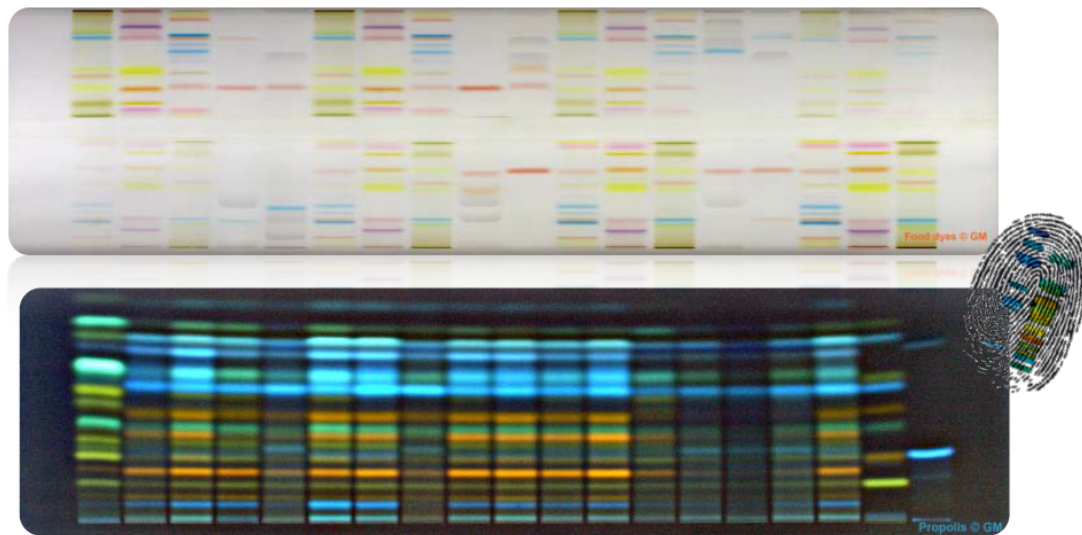


Les Eicosanoïdes : Analyse par HPTLC

Développer une technique de dosage et d'analyse des eicosanoïdes, basée sur l'HPTLC et couplée à la spectrométrie de masse :

Avantages

- Technique simple, rapide, peu coûteux et reproductible
- Analyse qualitative et quantitative des eicosanoïdes extraits des liquides biologiques et des tissus inflammatoires :
- ✓ Digitalisation d'une empreinte visuelle des échantillons
- ✓ Comparaison des empreintes chromatographiques de différentes situations physiopathologiques et sélectionner les familles de médiateurs à cibler





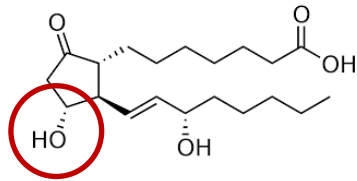
Les Eicosanoïdes : Analyse par HPTLC

Développer une technique de dosage et d'analyse des eicosanoïdes, basée sur l'HPTLC et couplée à la spectrométrie de masse :

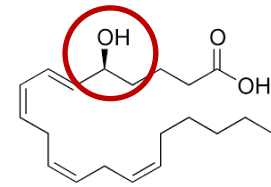
Contraintes

- La séparation sur plaque des médiateurs qui auraient des caractéristiques voisines, en structure et en polarité (PGE2 / PGD2 & 5-HETEs / 15-HETEs)

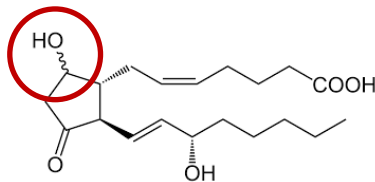
PGE2



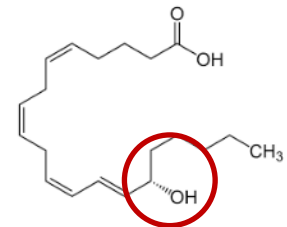
5-HETE



PGD2



15-HETE



- la sensibilité de détection de ces médiateurs (secrétés en très faibles quantité dans les liquides biologiques)



Les Eicosanoïdes : Analyse par HPTLC



Déposeur

- Plaque silice
- Dépôt : 20 µl

Migration

- Mélange : Acétate-éthyl / Eau / Isooctane / Acide acétique
- Migration : 7 cm

Scanner

- Lecture à 270 nm (LTB4 et LXA4)
- Lecture à 190 nm (PGs)

Derivatizer

- Acide phosphomolibdique

Visualizer

- Visualisation à 366 nm ou 254 nm



Eicosanoïdes étudiés :

15 HETEs

5 HETEs

PGA2

LTB4

PGD2

PGE2

TXB2

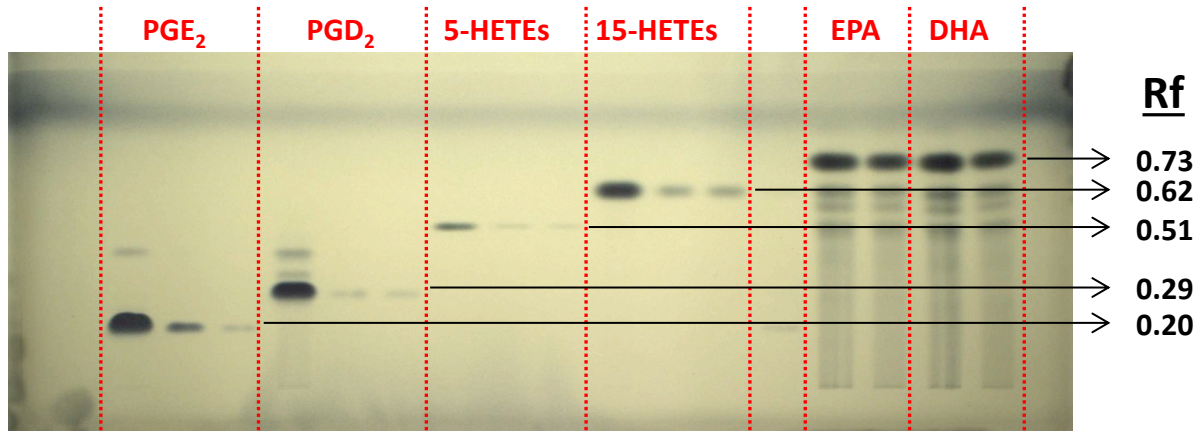
PGF2a

6 Kéto



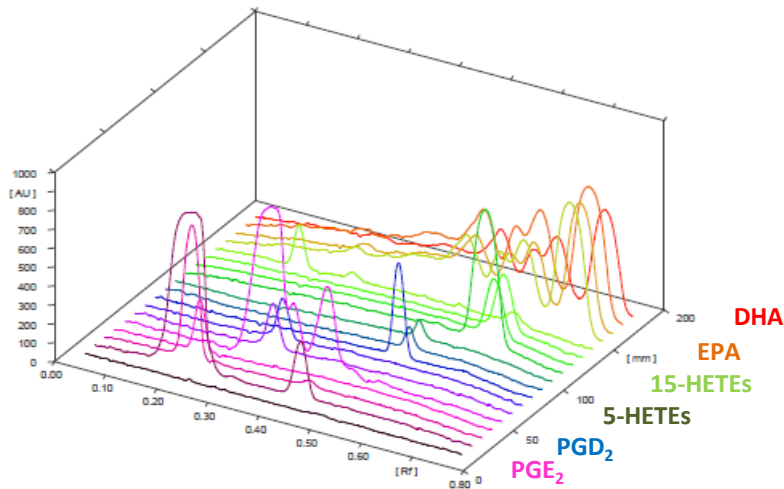
Les Eicosanoïdes : Analyse par HPTLC

Migration et analyse : PGE₂, PGD₂, 5-HETEs, 15-HETEs, DHA and EPA



Critères de migration :

- 1) Nombre de groupe hydroxyle
- 2) Nombre de double liaison
- 3) Nombre de groupe carbonyle
- 4) *Position du groupe hydroxyle*





Les Eicosanoïdes : Analyse par HPTLC

