

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le 5 juillet 2021  
Par M Alexandr GISH**

---

**DEVELOPPEMENT, VALIDATION ET MISE EN ŒUVRE D'UNE METHODE DE  
DOSAGE PAR CL-SM/SM DES ENDOCANNABINOIDES PLASMATIQUES**

---

**Membres du jury :**

**Président :** ALLORGE Delphine, PU-PH, PharmD, PhD, HDR

**Directeur de thèse :** GAULIER Jean-Michel, PH, PharmD, PhD, HDR

**Assesseur(s) :** DEVOS David, PU-PH, MD, PhD, HDR

ROLLAND Benjamin, PU-PH, MD, PhD, HDR



**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le 5 juillet 2021  
Par M Alexandr GISH**

---

**DEVELOPPEMENT, VALIDATION ET MISE EN ŒUVRE D'UNE METHODE DE  
DOSAGE PAR CL-SM/SM DES ENDOCANNABINOIDES PLASMATIQUES**

---

**Membres du jury :**

**Président :** ALLORGE Delphine, PU-PH, PharmD, PhD, HDR

**Directeur de thèse :** GAULIER Jean-Michel, PH, PharmD, PhD, HDR

**Assesseur(s) :** DEVOS David, PU-PH, MD, PhD, HDR

ROLLAND Benjamin, PU-PH, MD, PhD, HDR



## Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie

M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie – Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

### Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale

M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie

Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

### ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

## ***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

## Remerciements

Je tiens à remercier Madame le Professeur Delphine Allorge d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse et d'avoir suivi l'accomplissement de ce travail. Je vous remercie également de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre service de Toxicologie qui m'a permis de trouver ma vocation.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur le Professeur David Devos et à Monsieur le Professeur Benjamin Rolland pour l'honneur qu'ils m'ont accordé d'avoir accepté de prendre part au jury de mon travail.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Michel Gaulier pour avoir accepté de m'encadrer sur ce projet, pour votre suivi, vos conseils et tout le temps que vous avez investi dans ce travail. Je vous remercie également de m'avoir toujours soutenu dans les démarches administratives, ainsi que sur le plan personnel.

Je tiens à remercier également Madame le Docteur Marie Lenski, Monsieur le Docteur Benjamin Hennart, Monsieur le Docteur Nicolas Beauval, Monsieur Jean-François Wiart, Monsieur Luc Humbert, Madame le Docteur Camille Richeval, Madame Melodie Nachon, Madame Virginie Clin, Madame Marie Cugier, Monsieur le Docteur Florian Hakim, et à tous autres personnels de laboratoire de toxicologie de m'avoir soutenu durant la préparation de thèse et également pour tous les connaissances pratiques qui m'ont apporté.

Je remercie Madame Elodie Turpin de m'avoir aidé durant son stage et de son investissement dans ce projet.

Je suis reconnaissant à l'ensemble des professeurs de la Faculté de Pharmacie d'Université de Lille de m'offrir les connaissances nécessaires permettant aboutir mon projet.

J'adresse également tous mes remerciements :

A mes parents de pouvoir m'offrir la possibilité de faire mes études supérieures, leur soutien et leur encouragement tout au long de ces années,

A mes sœurs (Anastassiya et Alissiya) pour leurs présences et la joie qu'elles m'ont apporté,

A toute ma famille avec toute mon affection,

A Madame le Docteur Claire Tinez pour son soutien et son aide dans mes démarches administratives,

A Avand, Hashmee, Omar, Raza, Marc, Gyanish et tous mes autres amis de la faculté et de la résidence, pour avoir partagé des magnifiques moments ensemble,

A Malo, Ryane, Caroline, Thibault, Quentin et aux autres internes de biologie pour leurs gentillesse et les moments que nous avons passés ensemble

Au Madame Gaziza Amanbaï et tous les autres enseignants de gymnase N25 d'Almaty de m'avoir enseigné toute au long de mes années de l'école, collège et lycée.

## Table des matières

Introduction.....	18
RAPPELS.....	22
A- Le système endocannabinoïde .....	22
A-1 Introduction.....	22
A-2 Récepteurs du système endocannabinoïde.....	22
A-3 Les quatre molécules endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like.....	24
A-4 Métabolisme des endocannabinoïdes .....	26
A-5 Système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP).....	26
A-6 Système gastro-intestinal .....	29
A-7 Système hépatique .....	30
A-8 Système immunitaire .....	31
A-9 Système musculaire .....	31
B- Techniques chromatographiques et outils utilisés pour le dosage des endocannabinoïdes .....	33
B-1. Chromatographie gazeuse couplée au spectromètre de masse .....	33
B-2 Chromatographie liquide avec détection par barrette de diodes et par fluorescence.....	34
B-3 Chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse .....	34
B-3.1 Principe de chromatographie liquide et principe de la phase inverse.....	34
B-3.2 La spectrométrie de masse .....	35
TRAVAIL PERSONNEL .....	38
Introduction.....	38
A- Rationnel de l'analyse des ECS (AEA, 2-AG, OEA et PEA) .....	38
A-1 Endocannabinoïdes .....	45
A-1.1 Structure et chimie des endocannabinoïdes.....	45
A-1.2 Concentrations sanguines des endocannabinoïdes .....	45
A-1.3 Particularités d'ionisation en fonction du tampon utilisé dans la phase mobile de chromatographie.....	46

A-1.4 Problèmes des isomères .....	46
A-1.5 Endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like dans les éléments figurés du sang et influence de la vitesse de centrifugation.....	50
A-1.6 Stabilité.....	50
A-1.7 Contamination de PEA et OEA :.....	55
A-2 Méthodes de préparation des échantillons .....	55
A-2.1 Introduction.....	55
A-2.2 Les méthodes de prétraitement conventionnelles .....	55
A-2.3 Nouvelle méthodes d'extraction.....	57
B- Développement de la méthode de dosage.....	59
B-1 Préanalytique.....	59
B-1.1 Choix de la matrice et des anticoagulants .....	59
B-1.2 Extraction .....	60
B-1.3 Préparation des gammes et des contrôles .....	61
B – 1.4 Protocole préanalytique.....	61
B-2 Chromatographie .....	62
B-3 La spectrométrie de masse .....	65
B-4 Validation de méthode .....	66
B-4.1 Concentrations cibles .....	66
B-4.2 L'effet de matrice .....	66
B-4.3 Robustesse de la méthode .....	67
B – 4.4 Le rendement d'extraction .....	68
B-4.5 La stabilité .....	70
Discussion : .....	74
Conclusion :.....	78
Références .....	79

## Table des figures

Figure 1: Nombre de publications dans PubMed portant sur les endocannabinoïdes en fonction de l'année de parution (Mars,2021). .....	21
Figure 2 : Structures chimiques de THC et des endocannabinoïdes (A : THC ; B : AEA ; C : 2-AG). .....	24
Figure 3 : Nombre de publications dans PubMed portant sur PEA et OEA en fonction de l'année de parution (Mars,2021). .....	25
Figure 4 : Structures chimiques de l'OEA (A) et du PEA (B). .....	26
Figure 5 : Principe de l'électrospray (ESI) .....	36
Figure 6 : Les appareils pouvant être utilisés pour le dosage des endocannabinoïdes. (A) Waters XEVO® qTOF-XS ; (B) Waters XEVO TQ-S ; (C) Sciex Qtrap 6500+®, crédit photo du fabricant (115); (D) Thermofisher Q Exactive® UHMR Hybrid Quadrupole-Orbitrap crédit photo du fabricant (116). .....	37
Figure 7 : Isomérisation <i>in vitro</i> du 2-AG vers le 1-AG. ....	47
Figure 8 : Séparation entre l'OEA et ses isomères : l'éthanolamide cis-vaccénique (VEA), l'éthanolamide élaïdique (EEA), l'éthanolamide trans-vaccénique (tVEA), l'éthanolamide pétroselinique (PeEA) et l'éthanolamide trans-pétroselinique (t-PeEA) (158). .....	48
Figure 9 : Formule développée de AEA (A) et son isomère O-AEA (B).....	50
Figure 10 : Stabilité du 2-AG et du 1-AG : (A) stabilité dans le sang total et (B) et le plasma de 3 échantillons (P1 ;P2 ;P3) à température ambiante (RT) et à 4°C (RF), et (C) variation en fonction de la vitesse de centrifugation, selon Gurke <i>et al.</i> (148);...	52
Figure 11 : Stabilité de l'AEA, du PEA et de l'OEA. (A) stabilité dans le sang total et (B) du plasma de 3 échantillons (P1 ;P2 ;P3) à la température ambiante (RT) et à 4°C dans le réfrigérateur (RF). (C) variation en fonction de la vitesse de centrifugation, selon Gurke <i>et al.</i> (148). .....	54
Figure 12 : Chromatogrammes sans méthode de « column-switching » (A) et avec une méthode de « column-switching » (B), selon Ji,D <i>et al.</i> <i>A sensitive and accurate quantitative method to determine N-arachidonoyldopamine and N-oleoyldopamine in the mouse striatum using column-switching LC-MS-MS: use of a surrogate matrix to quantify endogenous compounds. Anal Bioanal Chem</i> 2014 (117). .....	58
Figure 13 : Schéma des étapes de la micro-extraction par liquide magnétique (MLME), selon Ding <i>et al.</i> <i>Investigation of changes in endocannabinoids and N-acyl ethanolamides in biofluids, and their correlations with female infertility. J Chromatogr A</i> 2017 (129). .....	59
Figure 14 : Protocole d'extraction .....	62

Figure 15 : Pics chromatographiques dans le PBS de 2-AG/1-AG (A), OEA (B), AEA (C), PEA (D) .....	63
Figure 16 : Stabilité dans le sang total (tube EDTA) à température ambiante (TA) et dans la glace (Glacé) réalisée sur 3 témoins sains. ....	70
Figure 17 : Stabilité dans le plasma à température ambiante (TA) et dans la glace (Glacé) réalisée avec 3 témoins sains.....	71
Figure 18: Niveaux des ECs plasmatique aux différents stades de sclérose en plaque par rapport au groupe de contrôle. [RPMS : « rémittente – progressive » ; SPMS : « progressive secondaire » PPMS : « progressive primaire »] Selon L. Jean-Gilles <i>et al.</i> <i>Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. J Neurol Sci.</i> 15 déc 2009 (181). ....	76

## Table des tableaux

Tableau 1 : Méthodes chromatographiques de dosage des endocannabinoïdes publiées depuis l'année 2010 .....	40
Tableau 2 : Données des masses exactes et des coefficients de partage. Source : « Chempider » (153).....	45
Tableau 3 : Gradient de séparation de l'OEA et de ses isomères (VEA, tVEA, EEA, PeEA, et tPeEA) avec en (A) eau avec 0,1% d'acide formique, et en (B) l'acétonitrile avec le débit à 0,5 mL/min, selon Röhrig et al. (158).....	49
Tableau 4 : Gradient permettant la séparation d'OEA et ses isomères (VEA, tVEA, EEA, PeEA et tPeEA) avec en (A) 65% d'eau, 35% 2-propanol et 0,05 % d'acide acétique, et en (B) l'acétonitrile et 0,05 % d'acide acétique avec le débit à 0,25 mL/min, selon Röhrig et al. (146).....	49
Tableau 5 : Etalon interne utilisé pour chaque molécule .....	61
Tableau 6 : Préparation des gammes et des contrôles .....	61
Tableau 7 : Gradient des phases mobiles .....	64
Tableau 8 : Séparation des isomères .....	65
Tableau 9 : Temps de rétention et les transitions MRM utilisées.....	65
Tableau 10 : Limites de détection et de quantification de la méthode [LOD : limite de détection, LOQ : limite basse de quantification, ULOQ : limite haute de quantification] .....	67
Tableau 11 : Tableau de la validation de méthode analytique (sans stabilité) [CV : coefficient de variation ; R <sup>2</sup> : R-carré ; CQI : contrôle qualité interne].....	69
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des performances de la méthode analytique .....	73

## **Abréviations :**

1-AG : 1-Arachidonoylglycerol  
2-AG : 2-Arachidonoylglycerol  
2-AG-D5 : 2-Arachidonoylglycerol-Deutéié (5 atomes de deutérium)  
2-OG : 2-oleoylglycerol  
4-DMABC : 4-(N,N-diméthylamino)benzoyl chloride  
AEA : Anandamide ou N-Arachidonoyléthanolamide  
O-AEA : O-arachidonoyl éthanolamine ou virodhamine)  
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor  
CB1 : Récepteur cannabinoïde de type 1  
CB2 : Récepteur cannabinoïde de type 2  
CL : Chromatographie Liquide  
COX-2 : Cyclooxygénase 2  
CQ : Contrôle qualité  
CQI : Contrôle qualité interne  
CV : Coefficient de variation  
DAG : Diacylglycérol  
DAGL : Diacylglycérol lipase  
DEA : docsaénaénoylethanolamide  
ECs : endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like  
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique  
EEA : elaidic acid ethanolamide  
ECNICI : Electron-capture negative-ion chemical ionization  
FAAH : Fatty Acid Amide Hydrolase  
Fluo : Fluorescence  
GC : Chromatographie gazeuse  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
UPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography  
LC : Chromatographie liquide  
LEA : dihomog- $\gamma$ -linolenoyl ethanolamide  
LLE : Extraction liquide-liquide  
LOD : Limite de détection  
LOQ : Basse limite de quantification  
MA : Maladie d'Alzheimer  
MAFP : Methyl Arachidonoyl Fluorophosphate

MAGL : Monoacylglycerol Lipase  
MAP : Mitogen Activated Protein Kinase  
MeOH : Méthanol  
MH : Maladie d'Huntington  
MLME : Micro-extraction par liquide magnétique  
NAAA : acylethanolamine-hydrolysing acid amidase  
NADA : N-arachidonoyl dopamine  
NAPE : N-acyl-phosphatidylethanolamine  
OEA : Oleoylethanolamide  
OLDA : N-oleoyldopamine  
PBS : Tampon Phosphate Salin (phosphate-buffered saline)  
PEA : Palmitoylethanolamide  
PEA-D4 : Palmitoylethanolamide-deutéié (4 atomes de deutérium)  
PeEA : petroselinic acid ethanolamide  
t-PeEA : trans-petroselinic acid ethanolamide  
PMSF : Fluorure de phénylméthanesulfonyle  
PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes  
SEA : Stéaroyléthanolamide  
SEC : un système endocannabinoïde  
SM/SM : Spectrométrie de Masse en Tandem  
SNC : Système Nerveux Central  
SNP : Système nerveux Périphérique  
SPE : Extraction Phase Solide  
 $\mu$ -SPE : micro extraction en phase solide  
 $\Delta$ -9-THC :  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol  
TOF : time of flight  
ULOQ : limite haute de quantification  
VEA : cis-vaccenic acid ethanolamide  
tVEA : trans- vaccenic acid ethanolamide

## Introduction

La plante *Cannabis sativa*, mieux connue sous les noms de marijuana ou de cannabis, longtemps utilisée en médecine humaine. Les plus anciens documents rapportant cet usage (en Chine, il y a environ 5000 ans) concernent le traitement de la douleur (1). Le siècle dernier a été celui de la découverte de la substance active principale, le  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ -9-THC), parmi 70 autres phytocannabinoïdes (2,3).

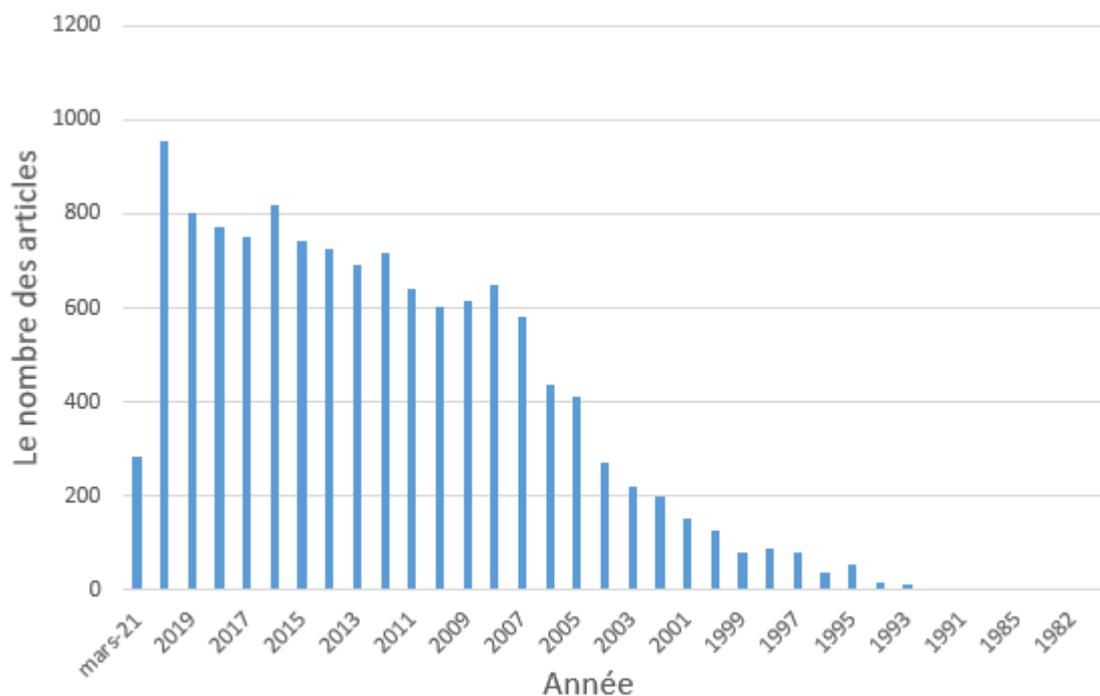
Mais le cannabis, à l'heure actuelle et d'un point de vue plus général, est surtout la substance illicite la plus consommée dans le monde (4). En 2017, en France, 44,8 % des adultes âgés de 18 à 64 ans déclarent avoir déjà consommé du cannabis au cours de leur vie (4). Cette consommation semble toucher plus particulièrement les jeunes adultes puisque la tranche d'âge 18-25 ans constitue 26,9% des consommateurs sur l'année 2017 en France (4). Si le nombre d'utilisateurs occasionnels a augmenté, le nombre de consommateurs quotidiens est également en hausse.

Lors d'un usage occasionnel, l'intoxication aiguë au cannabis se caractérise par des troubles de l'état de conscience avec désorientation temporelle et troubles mnésiques, perturbations sensorielles (vision, ouïe,...), troubles thymiques et dissociatifs : euphorie, anxiété, hallucinations. Ces effets sont variables selon la dose, la teneur en THC et la tolérance du sujet (5).

Les recherches sur les effets du cannabis sur l'organisme ont permis de découvrir les récepteurs cannabinoïdes (CB1, CB2) et des substances endogènes agonistes de ces récepteurs (endocannabinoïdes) qui constituent un système de régulation dit «système des endocannabinoïdes ». L'exposition au  $\Delta$ -9-THC est généralement accompagnée de modifications de la fonctionnalité de ce système endocannabinoïde (SEC) (6).

Le SEC est donc un système endogène complexe composé de récepteurs, de leurs ligands et des enzymes nécessaires à leur synthèse et leur dégradation. Les endocannabinoïdes sont des dérivés d'acides gras polyinsaturés. Depuis l'identification des récepteurs aux cannabinoïdes et de leurs ligands, de nombreuses études ont été menées pour comprendre les fonctions du SEC (Figure 1). Elles ont notamment permis de montrer l'implication du SEC dans les régulations de la

balance énergétique au niveau central et périphérique, de la réponse au stress ou encore de la plasticité cérébrale.



**Figure 1: Nombre de publications dans PubMed portant sur les endocannabinoïdes en fonction de l'année de parution (Mars,2021).**

L'objectif de ce travail de thèse est :

- de présenter le système endocannabinoïde,
- d'exposer l'intérêt de la mise en place d'une méthode de dosage plasmatique des endocannabinoïdes,
- de décrire les méthodes de dosage existantes pour les quatre substances endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like dont les propriétés biologiques sont les plus connues : AEA, PEA, 2AG et OEA,
- et de présenter mon travail personnel de mise en place et de validation d'une méthode de dosage plasmatique de ces endocannabinoïdes.

# RAPPELS

## A- Le système endocannabinoïde

### ***A-1 Introduction***

Le système endocannabinoïde ou endocannabinoïdome est un système endogène complexe puisqu'il est composé par les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, CB3 (GPR55), GRP119, TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) et PPAR  $\alpha$  et  $\gamma$ , les ligands de ces récepteurs (ECs) c'est à dire les molécules endocannabinoïdes et les molécules endocannabinoïdes-like, et les enzymes nécessaires à leur synthèse et leur dégradation (7–9).

### ***A-2 Récepteurs du système endocannabinoïde***

Le récepteur CB1 (cannabinoid receptor 1) est un récepteur couplé avec une protéine Gi (inhibition de la voie de signalisation de l'adénylate cyclase) avec signalisation de l'AMP cyclique et activation de la voie de MAP (mitogen-activated protein) kinase. Le gène codant pour le récepteur CB1 (CNR1) se situe sur le chromosome 6q14-15 (10). Ce gène code pour une protéine comportant 472 acides aminés. Le CB1 possède des propriétés de modulation des canaux ioniques, inhibant des canaux calciques, et stimulant les récepteurs potassiques (11). L'activation du CB1 est à l'origine de propriétés anxiolytiques, analgésiques, neuroprotectrices et antiémétiques (12,13). Il a été démontré dans les études animales que le  $\Delta$ 9-THC et les cannabinoïdes synthétiques ont des propriétés antinociceptives dans des modèles de pathologies liées à la douleur, neurodégénératives et inflammatoires (14).

Le récepteur CB2 (cannabinoid receptor 2) est codé par un gène CNR2 situé en 1p34-p35 et codant pour une protéine comportant 360 acides aminés. Ce récepteur ne présente que 44% d'homologie de séquence en nucléotides avec CB1 (15). Chez l'homme, il a été identifié 2 isoformes de CB2 (16). La distribution du récepteur CB2 est associée principalement avec le système immunitaire (17). CB2 régule la libération des cytokines et la migration des cellules immunitaires (18).

Le récepteur GPR55 (CB3) est composé de 319 acides aminés avec le gène qui se situe sur chromosome 2q37 (19). Celui-ci possède 14 à 15% d'homologie de

séquence avec CB1 et CB2 (20). Le récepteur GPR55 ne présente pas de site de liaison classique aux cannabinoïdes (21) mais l'anandamide et le virodhamine ont une activité d'agoniste partiel sur ce récepteur (22). Le ligand naturel du récepteur GPR55 est le L- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol (LPI) (20). Il a été démontré l'implication du récepteur GPR55 dans l'inflammation, les douleurs neuropathiques, certains désordres métaboliques, le développement osseux et les pathologies cancéreuses (23).

Le récepteur GRP119 est composé de 335 acides aminés avec le gène qui se situe sur le chromosome Xp26.1 (24). Ce récepteur est très répandu dans le pancréas et il est capable d'agir comme récepteur à l'insuline et à la stimulation par les différents métabolites des lipides exogènes mais aussi endogènes (25). Le *N*-oleoéthanolamine (OEA) et le 2-monoacylglycérol possèdent une activité agoniste sur ce récepteur (26). Les recherches récentes sur les agonistes et antagonistes exogènes du récepteur GRP119 ont démontré l'utilisation potentiel de ce récepteur comme cible dans le traitement du diabète et de l'obésité (27).

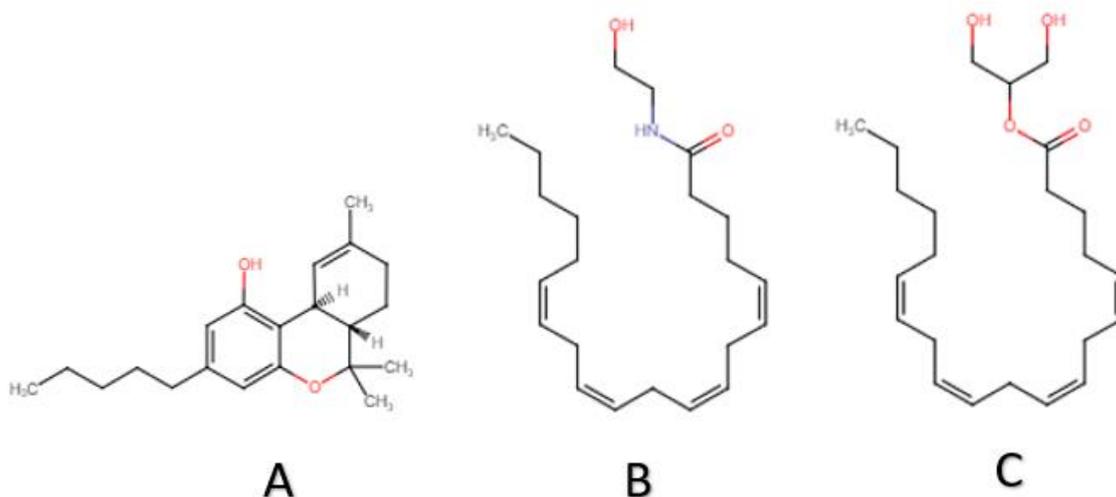
La sous-famille des récepteurs TRPV (transient receptor potential vanilloid) est composée de 6 récepteurs et est organisée en 4 groupes : TRPV1/TRPV2, TRPV3, TRPV4, et TRPV5/TRPV6 (28). TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPV4 sont modérément perméables pour les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et les récepteurs TRPV5 et TRPV6 sont très sélectifs pour les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (29). Le récepteur TRPV1, aussi connu comme le récepteur à la capsaïcine, a été le premier récepteur découvert et cloné de la sous famille des récepteurs TRPV1 (30). TRPV1, composé de 828 acides aminés, est codé par un gène se situant sur le chromosome X. Ce récepteur possède une structure quaternaire avec 6 domaines transmembranaires (31). L'activation de TRPV1 permet un influx extracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette activation est impliquée dans plusieurs mécanismes physiologiques comme la libération des neurotransmetteurs, l'excitabilité membranaire et la contraction musculaire (32). La similarité structurale entre la capsaïcine et l'arachidonoyléthanolamide a permis de déterminer l'activité activatrice de l'arachidonoyléthanolamide sur ce récepteur (33).

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) appartiennent à la grande famille des récepteurs nucléaires d'hormones qui est composée des récepteurs PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  et PPAR- $\gamma$ . Les récepteurs PPAR impliqués dans le système endocannabinoïde sont PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\beta$  qui sont codés par les gènes NR1C1 (chromosome 22) et NUC1/NR1C2 (chromosome 6), respectivement (34). Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de la transcription protéique, du

métabolisme lipidique et de la thermogénèse (34). L'anandamide en se fixant sur les récepteurs PPAR affecte de façon significative la transcription (35).

### **A-3 Les quatre molécules endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like**

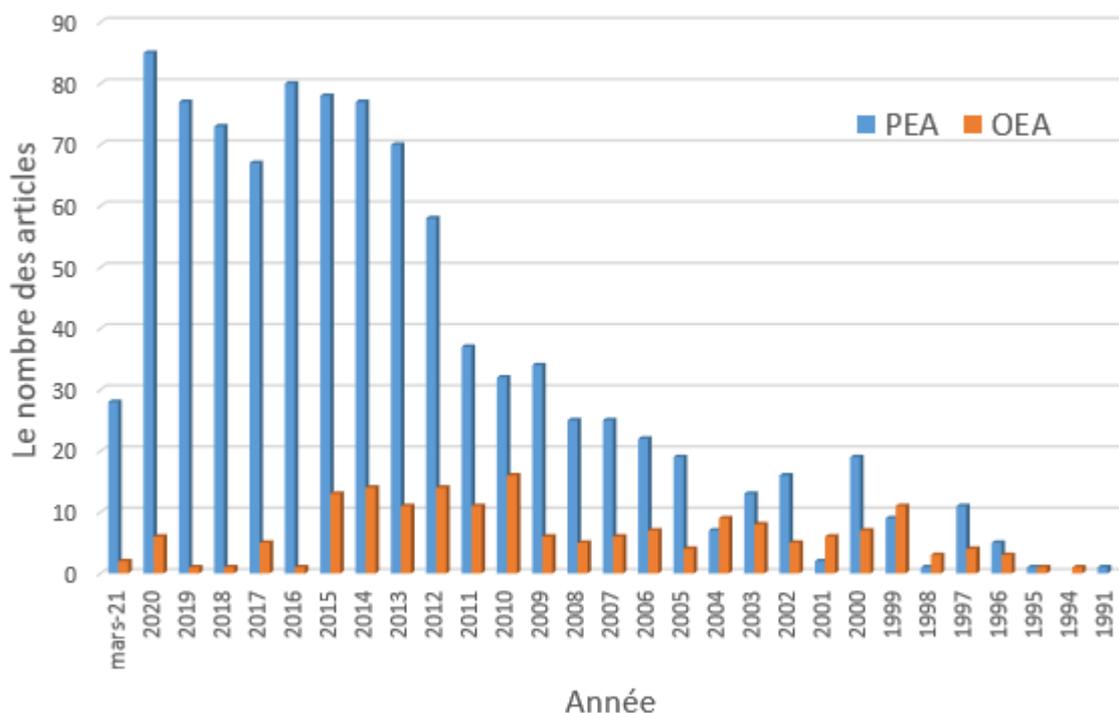
L'identification et le clonage du récepteur CB1 ont permis de découvrir le premier agoniste endogène de ce récepteur, l'arachidonoyléthanolamide (anandamide ou AEA) dans le cerveau porcin en 1992 (36). Au cours de ces recherches, il a été démontré que l'AEA ne permet de reproduire que partiellement les effets du THC sur l'organisme. Cette molécule possède une activité d'agoniste partiel sur les récepteurs CB1 et CB2. Ces observations ont mené à la découverte du 2-arachidonoylglycérol (2-AG), une autre substance importante dans le système endocannabinoïde (37,38). Le 2-AG a démontré une activité d'agoniste complet sur les récepteurs cannabinoïdes. Ces deux endocannabinoïdes sont actuellement les plus étudiés, mais il y a environ 13 autres molécules décrites qui ont des propriétés activatrices ou inhibitrices sur les récepteurs cannabinoïdes (39). La représentation structurale du THC, de l'AEA et de l'OEA est montrée dans la Figure 2.



**Figure 2 : Structures chimiques de THC et des endocannabinoïdes (A : THC ; B : AEA ; C : 2-AG).**

Les autres molécules qu'il est nécessaire d'aborder sont des médiateurs endocannabinoïdes-like. Ces médiateurs comportent la classe des *N*-acyle-amides à longues chaînes qui inclue les *N*-acyle-aurines, *N*-acyle-sérotonines, *N*-acyle-dopamines, les amides primaires des acides gras et les *N*-acyle acides aminés. Chacun de ces médiateurs possède une action sur sa propre cible ainsi que sa

propre voie métabolique. Ces voies métaboliques et ces récepteurs sont souvent partagés avec les molécules endocannabinoïdes, ce qui justifie le nom porté par ce complexe de signalisation : endocannabinoïdome (40). Dans ce travail, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux deux molécules endocannabinoïdes-likes suivantes : *N*-oleoylethanolamine (OEA) et *N*-palmitoylethanolamide (PEA). Ce choix est justifié par le nombre croissant de publications (surtout pour le PEA) en particulier dans le domaine de la recherche clinique (figure 3).



**Figure 3 : Nombre de publications dans PubMed portant sur PEA et OEA en fonction de l'année de parution (Mars,2021).**

La *N*-oleoylethanolamine a été découverte en 1963 dans l'intestin grêle et dans le tissu adipocytaire de cobaye albinos (41). La production d'OEA s'effectue à la demande dans les entérocytes, et, elle est stimulée par l'alimentation (42). Cette substance n'a pas d'activité directe sur les récepteurs cannabinoïdes. L'OEA a une action agoniste sur les récepteurs PPAR- $\alpha$  permettant l'activation de TRPV1 et une action agoniste sur les récepteurs GPR55 et GPR119 (43). Le *N*-Palmitoylethanolamide (PEA) a été isolé pour la première fois en 1958 dans le soja, le jaune d'œuf et la farine d'arachide (44). Les propriétés biologiques principales de cette molécule, comme l'effet anti-inflammatoire et analgésique, sont secondaires à l'activation des récepteurs PPAR- $\alpha$ , CB2, TRPV1 et GPR55 et à l'inhibition de l'hydrolase des amides d'acides gras (FAAH) et la cyclooxygénase de type 2 (COX-

2). Les recherches actuelles sont en particulier dirigées vers les propriétés antalgiques du PEA (45).

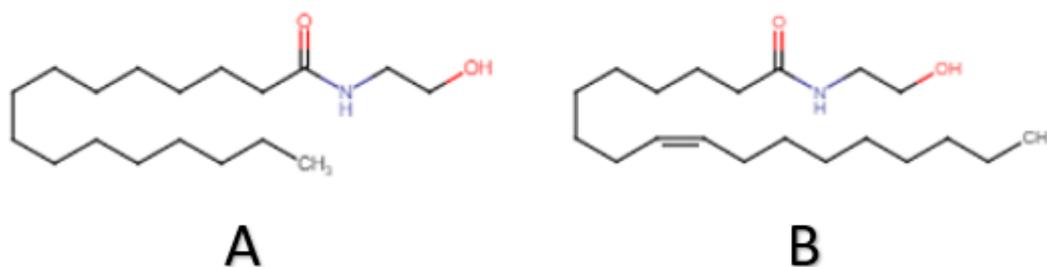


Figure 4 : Structures chimiques de l'OEA (A) et du PEA (B).

#### **A-4 Métabolisme des endocannabinoïdes**

L'AEA comme l'OEA et le PEA sont des molécules appartenant à la classe des *N*-acyléthanolamines (NAE). L'AEA est produit à la demande à partir de *N*-acyle-phosphatidyléthanolamine (NAPE) par la NAPE-spécifique phospholipase D (2). La dégradation se fait par une oxydation et/ou une hydrolyse au niveau intracellulaire. L'AEA est dégradée par la FAAH vers l'éthanolamine et l'acide arachidonique (46).

Le 2-AG est produit à partir du diacylglycérol par la DAG lipase alpha ou beta (46). Après production dans l'espace intracellulaire, l'AEA et le 2-AG diffusent passivement à travers la membrane cellulaire grâce à leurs propriétés hydrophobes. Le 2-AG est majoritairement hydrolysé par la monoacylglycérol lipase (MAGL) vers l'acide arachidonique et le glycérol (47).

L'OEA et le PEA sont principalement produits à la demande, comme AEA, à partir de la NAPE par la NAPE-spécifique phospholipase D sur la surface des membranes phospholipidiques (48,49). L'OEA est métabolisé en éthanolamine et acide oléique par la FAAH ou *acylethanolamine-hydrolysing acid amidase* (NAAA) (50,51). Le métabolisme du PEA en acide palmitique et éthanolamine s'effectue par la FAAH et la NAAA (50,52)).

#### **A-5 Système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP)**

La microscopie électronique et la microscopie de haute résolution ont permis de faire des progrès majeurs dans la définition de la structure de répartition des récepteurs cannabinoïdes au niveau du système nerveux central (SNC) et de ses implications dans la régulation de l'homéostasie. La localisation majoritaire du récepteur CB1 au niveau du SNC se situe au niveau présynaptique des neurones excitateurs et

inhibiteurs (53). L'autre point important est la présence de la diacylglycérol lipase (DAGL) (enzyme impliquée dans la biosynthèse de 2-AG) au niveau de la membrane post-synaptique et de la MAGL (enzyme responsable de la dégradation de 2-AG) au niveau des terminaisons axonales. Cette découverte a permis de mettre en évidence un système d'inhibition antérograde de la biosynthèse des endocannabinoïdes, particulièrement pour le 2-AG (54) et de définir l'application des endocannabinoïdes dans les processus d'excitation et d'inhibition de la neurotransmission, de la potentialisation et de la dépolarisation neuronale (55). Des récentes études ont souligné le rôle important du SEC dans la plasticité cérébrale à court et long terme. Tout d'abord, le SEC, et plus particulièrement les CB1, sont impliqués dans la neurogénèse et dans la régulation du *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Ce facteur de croissance facilite la survie et le fonctionnement des neurones (56). En effet, des souris CB1<sup>-/-</sup> montrent des niveaux de BDNF dans l'hippocampe significativement plus bas que celui de souris sauvages en condition de repos et en réponse à un stress (57). De plus, une activation chronique des CB1 peut induire une augmentation du contenu en BDNF dans certaines zones du cerveau (58). Deuxièmement, les cellules progénitrices neurales expriment abondamment le CB1 capable de favoriser *in vitro* la différenciation et la maturation neuronale des cellules astrocytaires par une inhibition de la voie de signalisation impliquant *Extracellular signal-regulated kinases* 1/2 (ERK1/2) (59). En conséquence de cela, il a été montré l'effet de la concentration importante d'AEA dans le SNC qui est corrélée avec une augmentation de l'activité des CB1 dans l'hippocampe permettant une neurogénèse hippocampique (60,61). L'expression des CB1 ne se limite pas aux neurones pré-synaptiques, mais concerne également les neurones post-synaptiques. Les CB1 post-synaptiques possèdent une activité sur l'interneurone du néocortex qui modifie l'expression des peptides responsables du contrôle de l'appétit (62).

Une forte expression du CB1 est observée dans le bulbe olfactif, l'hippocampe, les noyaux gris centraux et le cervelet. Une expression modérée de CB1 est observée dans le cortex cérébral, le septum, l'amygdale et l'hypothalamus. Une faible expression est observée au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière (63). Au niveau du système nerveux périphérique, le CB1 est exprimé au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques (64). Le CB1 est observé dans le ganglion du nerf trijumeau, les ganglions dorsaux et les terminaisons des nerfs cutanés (régulation de la nociception à partir des nerfs afférents) (65).

De nombreuses études démontrent un rôle majeur des CB2 dans la régulation immunitaire du SNC avec une expression de ce récepteur sur les cellules microgliales. La stimulation des CB2 diminue l'effet pro-inflammatoire des cytokines libérées à partir des microglies dans la maladie d'Alzheimer (66). Comme le récepteur CB1, le récepteur CB2 est impliqué dans la neurogénèse et la formation de la barrière hématoencéphalique (67,68).

L'implication des autres récepteurs de l'endocannabinoïdome au niveau du SNC a également été étudiée. Il a été démontré l'implication de TRPV1 dans la plasticité synaptique à court et long terme avec une implication au niveau de la mémoire, de l'humeur, de la peur, de l'alimentation et du développement visuel et de la locomotion (69). L'activation des récepteurs PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\gamma$  présents sur les astrocytes, les cellules microgliales et les neurones, produit une activité anti-inflammatoire et neuroprotectrice (70).

L'AEA, par potentialisation des effets de la sérotonine sur les récepteurs 5-HT $1a$  à 89% et l'inhibition de 5HT $2a$  à 36%, permettrait une action pharmacologique dans le traitement des migraines aiguës et chroniques (71).

Après la première démonstration des propriétés anxiolytiques des phytocannabinoïdes en 1981 par Fabre et McLendon (72), de nombreuses études ont été menées pour étudier l'impact du système endocannabinoïde dans les maladies psychiatriques. Néanmoins, les connaissances dans le mécanisme exact du processus pathologique demeurent mal connues (73). Une diminution du taux d'AEA a été observée chez des patients souffrant de maladies psychiatriques liées au stress, incluant une dépression majeure et un syndrome post-traumatique (74). Chez des souris avec une déplétion génétique en DAGL et une réduction de la signalisation, une augmentation de l'anxiété a été observée (75). L'augmentation du taux d'AEA et de PEA a été observée chez des patients souffrant de schizophrénie dans les cellules du liquide cébrospinal (76). Ce résultat est corrélé avec la concentration sanguine d'AEA qui est significativement augmentée ( $2,71 \pm 0,17 \mu\text{g/L}$  contre  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$  dans la groupe témoin,  $p\text{-value } 4,5 * 10^{-8}$ ) dans la schizophrénie aiguë avec une normalisation pendant la rémission ( $1,35 \pm 0,25 \mu\text{g/L}$  contre  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$  dans la groupe témoin,  $p\text{-value } 0,16$ ) (77). Néanmoins, une autre étude menée ne présente pas les mêmes résultats d'augmentation du taux d'AEA ( $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$  contre  $1,1 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$  dans le groupe témoin), cette même étude ne démontre également pas d'augmentation de l'OEA ( $1,6 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$  contre  $1,3 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$  dans la groupe témoin) (78).

L'autre aspect important à aborder dans le domaine de la psychiatrie est l'exposition aux substances exogènes psychoactives et les troubles addictifs. Étant donné que la production des endocannabinoïdes se fait à la demande, et est associée à une tonalité de signalisation modeste, l'hypothèse émise est que l'exposition aux xénobiotiques psychoactifs peut être associée à une augmentation de la production des molécules endocannabinoïdes (77). Les données de la littérature montrent une augmentation d'AEA et de 2-AG dans les cultures cellulaires neuronales hippocampiques exposées à 2 g/L d'alcool (79). Ces données ont été confirmées par une autre publication avec des cellules neuronales de noyau *accumbens* (80). Cette stimulation du SEC par l'éthanol semble dépendre de la zone du cerveau et agir en tant qu'inhibiteur lors d'une exposition aiguë à l'éthanol (81). De la même manière qu'avec l'alcool, les injections répétées de nicotine chez des rats sont associées avec une augmentation du taux d'AEA dans la zone limbique et dans le tissu du striatum, mais avec une diminution des taux d'AEA et de 2-AG dans le tissu cortical (82). L'exposition des rats aux opiacés montre une augmentation d'AEA et une diminution 2-AG dans le striatum, la zone limbique et l'hippocampe (81). Enfin, l'exposition de rats à la cocaïne provoque une diminution de la concentration de 2-AG au niveau du cortex frontal et tissu hippocampique (83–85).

Chez l'homme, une diminution du taux plasmatique d'AEA et d'OEA a été observée dans le cas de troubles addictifs (cannabis, alcool, cocaïne) par l'équipe de Desfosses : concentration moyenne d'AEA de 0,7 +/- 0,2 µg/L (à comparer avec le groupe témoin 1,1 +/- 0,4 µg/L ; p-value à 0,001) et celle d'OEA de 1,0 +/- 0,5 µg/L (à comparer avec le groupe témoin 1,6 +/- 0,7 µg/L) (78). L'autre molécule qui joue un rôle important dans la neuroprotection et la promotion de la consolidation de la mémoire est l'OEA via le PPAR-α (86).

## **A-6 Système gastro-intestinal**

L'endocannabinoïdome joue un rôle au niveau du tube digestif dans la modulation de la mobilité gastro-intestinale, la sécrétion de l'acide gastrique, les hormones, les neurotransmetteurs, la perméabilité de l'épithélium intestinal, et dans l'expression des microbiotes. À partir de l'hypothalamus, il permet une régulation de l'appétit et de la balance énergétique. L'action des ECS est largement médiée par l'action sur CB1 (87). Il y a une régulation par l'AEA, le 2AG et l'OEA, de la prise alimentaire et de la sensibilité pour les lipides (88). L'OEA régule en particulier l'absorption des acides gras par une activation de deux voies homéostatiques vagues des nerfs afférents

(89) et l'activation de CB2 normalise la motilité gastrique. Les ECs sont importants dans le système anti-inflammatoire permettant la réduction de la toxicité gastrique et de l'inflammation intestinale en conduisant à un blocage du développement des colites (90).

L'AEA joue un rôle dans la physiopathologie du syndrome du côlon irritable dans lequel il a été démontré une augmentation du nombre des récepteurs TRPV1 au niveau du colon. Une hypothèse d'application du cannabidiol (CBD) dans la prise en charge des colites consiste en une augmentation du niveau d'AEA par le CBD, ce qui permettrait une désensibilisation de TRPV1 avec une diminution des symptômes. (76,91).

### **A-7 Système hépatique**

L'expression de l'ARN messager codant pour CB1 au niveau hépatique est faible, mais peut être induite au cours d'une stéatose hépatique. L'activation des CB1 dans les hépatocytes induit la voie de la lipogénèse (92,93) et contribue à l'hyperinsulinisme. Ce récepteur a une activité au niveau de la signalisation de l'insuline (IRS1 et Akt-2) avec comme résultat, une activation de la glycogénèse (94). Une activation du récepteur CB1 provoque la croissance de tissu conjonctif et le développement de fibrose (95). En phase de cirrhose, ce récepteur induit une vasodilatation hépatique, provoquant une prédisposition dans la formation d'ascite et des varices œsophagiennes (96).

Il a été démontré un rôle des CB2 dans les propriétés anti-fibrogéniques par l'action sur les myofibroblastes et les cellules stellaires. Le traitement par JWH-133, agoniste de CB2, de rats prétraités par tétrachlorométhane induisant une fibrose du foie, a démontré une réduction de la pression portale. L'activité des CB2 sur les fibroblastes diminue la production d'IL-17 et de Th17 lymphocytaire (97). Les propriétés anti-inflammatoires des CB2 (dans l'inflammation hépatique) s'effectuent par induction de l'héméoxygénase-1 et une diminution de l'accumulation des acides gras par effet indirect sur la diminution de l'IL-1 $\beta$  (98).

Après transplantation hépatique, il a été démontré chez des rats un rôle de CB2 dans la diminution de l'infiltrat inflammatoire et des cytokines pro-inflammatoires et l'induction de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales du foie (99).

La production des endocannabinoïdes, notamment de l'AEA et du 2-AG, au niveau hépatique est assurée par les hépatocytes et les cellules endothéliales (95). Des

études récentes ont démontré des liens entre le système endocannabinoïde, le métabolisme hépatique, la stéatose hépatique et la cirrhose (95). Dans ces études, il a été mis en évidence une augmentation de la concentration plasmatique d'AEA et de 2-AG chez des patients avec une stéatose hépatique non alcoolique, quel que soit leur IMC. Ce processus semble être associé à plusieurs fonctions hépatiques (100). Au stade de cirrhose, l'AEA périphérique reste augmenté avec une augmentation de l'OEA et du PEA. Le taux de 2-AG reste inchangé (101).

L'élévation des endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like s'effectue en réponse à l'évènement pathologique. Il a été démontré que l'AEA possède une activité anti-fibrogénique avec une inhibition de la prolifération des cellules conjonctives (102). Et parallèlement, les propriétés anti-inflammatoires de PEA sont associées à l'activation du récepteur PPAR $\alpha$  avec une inhibition de la réponse immunitaire (33).

### ***A-8 Système immunitaire***

L'endocannabinoïdome joue un rôle dans la signalisation des cellules immunitaires, en particulier dans la réponse immunitaire adaptative (103). Le 2-AG en activant le récepteur CB2, inhibe la réponse immunitaire et la migration des cellules immunitaires (104). L'AEA inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires, et provoque une diminution des niveaux d'IL6 et IL8. En activant le récepteur de CB2, l'AEA diminue une libération d'IL-2, de TNF alpha et d'INF gamma par les lymphocytes T activés périphériques (105).

### ***A-9 Système musculaire***

Dans le tissu musculaire, l'activation des récepteurs cannabinoïdes provoque une diminution de la sensibilité à l'insuline (106) et l'entrée du glucose dans la cellule (107). La stimulation des CB1 dans le tissu adipeux induit la lipogenèse (108). De nombreuses recherches s'intéressent actuellement à l'association entre l'endocannabinoïdome et l'exercice physique. Celles-ci ont mis en évidence l'augmentation des concentrations d'AEA suite à un exercice physique (109). Koltyn et al. ont complété ces résultats et ont constaté une élévation d'autres endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like tels que le PEA, l'OEA (106), le docsahexaenoylethanolamide (DEA) et le 2-oleoylglycerol (2-OG) (110). Ainsi, la stimulation du système endocannabinoïde aurait un effet néfaste lors des adaptations induites par l'exercice physique.

La première partie bibliographique de ce manuscrit présente l'implication de système endocannabinoïdes dans les nombreuses fonctions de l'organisme. Au bilan, le panorama actuel des connaissances du système endocannabinoïde justifie l'intérêt potentiel de méthodes de dosages plasmatiques des substances endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like autant dans les futures études fondamentales que dans les projets de recherche (et applications potentielles) cliniques (diagnostic et suivi).

## **B- Techniques chromatographiques et outils utilisés pour le dosage des endocannabinoïdes**

A l'heure actuelle, les méthodes les plus courantes de dosage des endocannabinoïdes sont basées sur la technique de chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM). Mais différentes approches techniques (certaines plutôt historiques et aujourd'hui obsolètes) ont été utilisées dans les dosages des principaux endocannabinoïdes étudiés : 2-AG et AEA. Les techniques référencées dans la littérature sont donc (111) :

1. La chromatographie gazeuse couplée avec détection par spectrométrie de masse (CG-SM et CG-SM/SM)
2. La chromatographie liquide avec détection UV par barrette de diodes (CL-UV/BD)
3. La chromatographie liquide avec détection par fluorimétrie (CL-Fluo)
4. La chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse (CL-SM et CL-SM/SM)

### ***B-1. Chromatographie gazeuse couplée au spectromètre de masse***

L'utilisation des techniques de chromatographie gazeuse implique une étape préalable de dérivation permettant une sensibilité et spécificité suffisantes dans le dosage des endocannabinoïdes (111). L'étape de dérivation permet en effet d'augmenter la stabilité et la volatilité de ces substances. Néanmoins, Maccarrone *et al.* rapportent la possibilité d'utilisation de la chromatographie gazeuse sans dérivation pour le dosage d'ECs dans les cellules tumorales humaines et les cultures de cellules humaines. Cette application est probablement possible en raison de la grande quantité de ces endocannabinoïdes dans ces matrices (112). L'avantage de la dérivation est plus marqué dans l'*electron-capture negative-ion chemical ionization* (ECNICI) permettant une génération de quelques ions majoritaires et de haute sensibilité par attachement de groupement chimique ou d'atome avec une forte capacité d'attraction d'électrons. (111).

## ***B-2 Chromatographie liquide avec détection par barrette de diodes et par fluorescence***

Compte tenu des propriétés structurales des ECs et de l'absence de structure chromophore et fluorophore, la dérivation chimique est également nécessaire pour leur détection en UV ou par fluorescence. Les deux méthodes décrites dans la littérature permettent (i) le dosage de l'AEA après une dérivation avec le chlorure de dansyl absorbant en UV (113), et (ii) le dosage de l'AEA et du 2-AG en fluorescence après la dérivation avec du 4-(N – chloroformylmethyl – N – methyl ) amino – 7 - N,N – dimethylaminosulphonyl - 2,1,3 benzoxadiazol (114). Les limites de ces méthodes de dosage sont une sensibilité faible et une étape spécifique préalable de dérivation pour l'analyse.

## ***B-3 Chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse***

La chromatographie liquide (en phase inverse) couplée à la spectrométrie de masse est devenue la technique de référence pour le dosage des endocannabinoïdes en raison de ses grandes sensibilité et spécificité. Elle est adaptée aux faibles concentrations de ces molécules et à leurs propriétés physicochimiques. A l'heure actuelle, de nombreuses méthodes chromatographiques en CL-SM/SM sont développées pour les dosages des ECs dans différentes matrices : urine, foie, lait, liquide cébrospinal, cellules cultivées in vitro, sang totale, plasma, sérum, cheveux et tissu cérébral.

### **B-3.1 Principe de la chromatographie liquide et principe de la phase inverse**

L'échantillon à analyser en solution est poussé à travers une colonne séparative par un liquide (la phase mobile). La phase stationnaire, polaire (phase normale) ou apolaire (phase inverse), est placée dans la colonne et permet la rétention plus ou moins importante des composés dans l'échantillon. Ces composés sont élués de la colonne par les différentes phases mobiles en fonction de leurs propriétés hydrophiles et donc en fonction de leur partage entre les phases solides et liquides. L'élution peut se faire soit en mode isocratique (sans changement de la composition

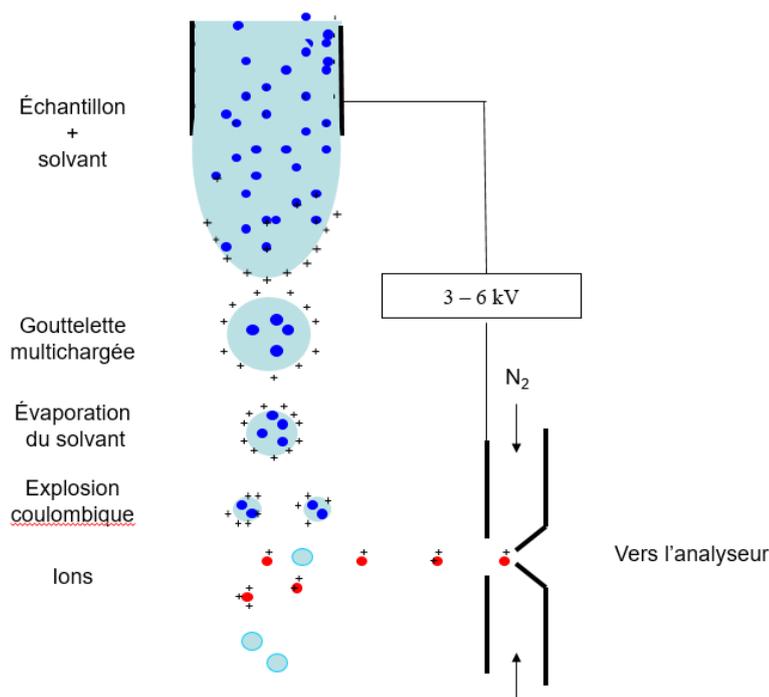
de phase mobile au cours de la chromatographie) soit en mode gradient (avec la modification de la constitution des phases mobiles au cours de la chromatographie).

La chromatographie en phase inverse utilise des colonnes séparatives avec des chaînes alkyles hydrophobes (C8 ou C18) greffées sur une phase stationnaire au niveau des groupes silanols (SI-OH) et l'élution utilise des phases mobiles hydrophiles.

## **B-3.2 La spectrométrie de masse**

### **B-3.2.1 Principe de l'électrospray**

Les molécules d'intérêt dans la phase mobile traversent un tube capillaire porté à un haut potentiel électrique. Le champ électrique appliqué dans le cône de Taylor provoque alors la formation de gouttelettes chargées de gros diamètre à la sortie du cône. Sous l'influence d'un gaz de désolvatation à haute température, la phase mobile « s'évapore », provoquant la diminution du diamètre des gouttelettes chargées jusqu'à l'obtention des ions libres, chargés selon le mode d'ionisation (positif ou négatif). Ces ions sont ensuite dirigés, à l'aide de différences de potentiels électriques, sur la contre électrode dans le cône de l'échantillonneur. Durant le parcours, les ions subissent l'effet des collisions avec les molécules de gaz et la pression élevée permet leur désolvatation complète. La tension au niveau du cône échantillonneur permet une variation de collision des ions moléculaires, et de ce fait, une fragmentation plus au moins importante de ces ions. Ce phénomène est appelé dissociation par collision induite. La représentation schématique du principe de l'électrospray est montrée dans la Figure 5.



**Figure 5 : Principe de l'électrospray (ESI)**

### **B-3.2.2 Techniques de détection par spectrométrie de masse**

Les spectromètres de masse séparent les ions en fonction de leurs masses divisées par leurs charges ( $m/z$ ). Les différentes techniques de spectrométrie de masse se différencient par leurs capacités de résolution : basse résolution (quadripôle, trap ionique) et haute résolution [Time of Flight (TOF), détecteur par résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier et l'Orbitrap]. Les analyseurs de basse résolution permettent de mesurer avec précision les masses nominales (100 mDa) des ions, et les appareils de haute résolution permettent de mesurer la masse exacte des molécules avec la précision de quelques mDa. Les principales techniques de détection utilisées dans les méthodes de dosage des endocannabinoïdes répertoriées dans la littérature (Figure 6) sont les suivantes :

- Triple quadripôle
- Qtrap
- qTOF (quadripôle couplé à l'analyseur Time of Flight)
- Orbitrap



Figure 6 : Les appareils pouvant être utilisés pour le dosage des endocannabinoides. (A) Waters XEVO® qTOF-XS ; (B) Waters XEVO TQ-S ; (C) Sciex Qtrap 6500+®, crédit photo du fabricant (115); (D) Thermofisher Q Exactive® UHRM Hybrid Quadrupole-Orbitrap crédit photo du fabricant (116).

# TRAVAIL PERSONNEL

## Introduction

Lors de l'initiation de ce projet (mise en place d'une méthode de dosage des endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like sanguins), le choix de la technique de détection a été réalisé sur la base de l'obtention d'une sensibilité suffisante. L'outil disponible dans le laboratoire pouvant donner une sensibilité et une précision suffisante sur les concentrations très basses des endocannabinoïdes était le XEVO® TQ-S® (Waters, USA) basé sur la technique de triple-quadripôle.

Un quadripôle est composé de quatre électrodes cylindriques parallèles et utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur  $m/z$ . Ces quatre électrodes sont associées deux par deux pour que les électrodes opposées soient au même potentiel. Un potentiel sinusoïdal appliqué sur les électrodes permet de focaliser les ions : schématiquement, si le potentiel de l'électrode change avant que l'ion ne se soit déchargé sur elle, il changera de direction et entrera en résonance. Ainsi, l'ion traversera l'analyseur (117). Cette séparation permet (i) une élimination des ions sans intérêt en dehors du quadripôle et le passage des seuls ions d'intérêt, et (ii) en conséquence, d'augmenter la sensibilité et de diminuer les ions interférents. L'association des quadripôles en tandem permet d'établir des transitions (ion moléculaire vers le fragment d'ion).

## A- Rationnel de l'analyse des ECS (AEA, 2-AG, OEA et PEA)

Les échantillons biologiques sont des matrices complexes composées de multiples substances telles que les protéines, les lipides, les acides aminés et les phospholipides pouvant présenter des interférences lors des dosages (118). La mise au point d'une méthode de dosage plasmatique de molécules telles que les endocannabinoïdes est particulièrement complexe à cause des propriétés de ces substances :

- des concentrations sanguines physiologiques très basses, nécessitant une sensibilité de détection performante,
- une faible stabilité de ces molécules à la température ambiante ainsi qu'une isomérisation spontanée,
- un volume d'échantillon biologique faible,
- des interférences analytiques telles que :

- un bruit de fond avec l'effet de suppression d'ions diminuant la sensibilité de la méthode ;
- une co-élution avec d'autres molécules endogènes et/ou exogènes nécessitant l'adaptation des conditions chromatographiques.

L'ensemble de ces difficultés implique la nécessité d'une étape de purification pré-analytique pour éliminer un maximum de substances indésirables pouvant interférer dans le dosage, et ainsi, permettre d'améliorer la sensibilité et de minimiser l'effet de matrice (119). Le Tableau 1 représente l'ensemble des méthodes répertoriées dans la littérature sur la période de 2010 à 2020 (inclus). Précédemment, une telle revue de la littérature a été réalisée par l'équipe de Zoerner *et al.* avec une synthèse bibliographique de 1998 à 2010 (111) et par l'équipe de Marchioni *et al.* de l'année 2010 à 2017 (120).

**Tableau 1 : Méthodes chromatographiques de dosage des endocannabinoïdes publiées depuis l'année 2010** [Ext. : type d'extraction ; R. : Références ; SPE : l'extraction en phase solide ; LLE : l'extraction liquide-liquide ; SLE : l'extraction solide-liquide ;  $\mu$ -SPE : micro l'extraction en phase solide ; « Column switching » : l'utilisation d'une seconde colonne de purification ; MLME : microextraction par liquide magnétique AEA : arachidonylethanolamide ; O-AEA : virodhamine ou O-arachidonylethanolamine ; 2-AG : 2-arachidonoylglycerol ; 1-AG : 1-arachidonoylglycerol ; OEA : N-oleoylethanolamine ; PEA : N-palmitoylethanolamide ; SEA : stearoylethanolamide ; 2-AGE : 2-arachidonyl glycerol ether ; NADA : N-arachidonoyl dopamine ; LEA : dihomog- $\gamma$ -linolenoyl ethanolamide ; DHEA : docosahexaenoyl ethanolamide ; LNEA : N-a-linolenoylethanolamide ; DEA : docosatetraenoyl ethanolamide ; NAGly : N-arachidonylglycine ; EPEA : N-eicosapentaenoylethanolamide ; POEA : palmitoleoylethanolamide ; 2-LG : 2-linoleoylglycerol ; OLDA : N-oleoyldopamine ; NASer : N-arachidonylserine ; AA : acide arachidonique ; PGE2 : prostaglandine E2 ; THB B2 : tetrahydroberberine B2 ; STERDA : N-stearoyldopamine ; DGLEA : N-dihomog- $\gamma$ -linolenoylethanolamide ; DHA : acide docosahexaénoïque ; PG : palmitoyl glycerol ; OG : oleoyl glycerol ; DHG : docosahexaenoyl glycerol ; EPG : eicosapentaenoyl glycerol ; EG : eicosenoyl glycerol ; 11-DHC : 11-dehydrocortisone ; DHT : dihydrotestosterone LC : chromatographie liquide ; HPLC : chromatographie liquide de haute performance ; UPLC : chromatographie liquide de ultra-performante ; MS : spectrométrie de masse.]

Molécules recherchées et dosées	Matrices	Extraction	Colonne et phases mobiles	Méthode	Ref
AEA	Tissus de l'appareil reproducteur féminin, Plasma	SPE	Phase stationnaire BEH C18 A. Eau + 2 mM d'acétate d'ammonium + 0,1% d'acide formique B. Acétonitrile + 0,1% d'acide formique	UPLC-MS/MS (Quattro Premier tandem mass spectrometer, Waters)	(121,122)
AEA, OEA, PEA et SEA	Plasma, sérum, plasma du cordon ombilicale, urine, salive, liquide amniotique, lait, liquide péritonéal	SPE	Phase stationnaire BEH C18 A. Eau + 2 mM d'acétate d'ammonium + 5% d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique B. Acétonitrile + 0,1% d'acide formique	UPLC-MS/MS (Quattro Premier tandem mass spectrometer, Waters)	(123)
AEA, 2-AG, O-AEA, 2-AGE, NADA, LEA, DHEA, PEA et OEA	Cellules cérébrales humaines et de rat	SLE	Phase stationnaire Zorbax Eclipse XDB-C18 • Chromatographie isocratique avec de 33% d'eau, 67% d'acétonitrile et acide formique 0,1%	UPLC-MS/MS (Agilent 6410 Triple quadripole MS)	(124)
2-AG et AEA	Plasma	LLE	Phase stationnaire BEH C18 A. Eau + 2 mM d'acétate d'ammonium + 5% d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique B. Méthanol + 2 moles d'acétate d'ammonium	UPLC-MS/MS (XEVO TQ MS, Waters)	(125)
AEA, PEA, LEA, OEA, DHEA, LNEA	Plasma et le foie du rat de blé	SPE et LLE	Phase stationnaire Kinetex XB C18 A. Eau + 0,1% d'acide formique B. Acétonitrile + 0,1% d'acide formique	UPLC-MS/MS (Quattro micro API mass spectrometer, Milford)	[111]

AEA, 2-AG, DHEA, LEA, OEA, PEA et SEA	Plasma	Précipitation protéique	Phase stationnaire BEH C8 A. Eau 40% + méthanol 40% + acétonitrile 20% + d'acide formique 0,1% B. Méthanol 70% + acétonitrile 30% + d'acide formique 0,1%	UPLC-MS/MS (XEVO TQ-S, Waters)	(126)
2-AG et AEA	Plasma	Précipitation protéique et $\mu$ -SPE	Phase stationnaire Kinetex XB C18 A. Eau B. Méthanol + 2,5 mM d'acide formique	HPLC-MS/MS (API 2000, PE Sciex)	(127)
2-AG, AEA, LEA DHEA, PEA et OEA	Cerveau	SLE	Phase stationnaire Zorbax Eclipse XDB-C18 • Chromatographie isocratique avec de 33% d'eau, 67% d'acétonitrile et acide formique 0,1%	UPLC-MS/MS (Agilent 6410 Triple quadripole MS)	(124,128)
2-AG et AEA	Plasma	LLE	Phase stationnaire Zorbax C18 A. Eau avec 5mM de formiate d'ammonium B. Méthanol	UPLC-MS/MS (API 4000 triple quadripole, PE Sciex)	(129)
AEA, 2-AG, O-AEA, 2-AGE, NADA, PEA, OEA, DEA, NAGly, EPEA, DHEA, POEA, LEA, SEA, 2LG.	Lait, Plasma, Cellules de culture, tissus	SPE	Phase stationnaire BEH C18 A. Eau avec 5mM de formiate d'ammonium B. Méthanol	UPLC-MS/MS (Micromass Quattro Ultima)	(130)
AEA, PEA, OEA, LEA, LNEA, EPEA	Plasma, urine, culture cellulaire	SPE	Phase stationnaire HSST3 C18 A. Eau + 0,1% d'acide formique B. Acétonitrile 95% + eau 5% + 0,1% d'acide formique	UPLC-qTOF-MS (AB Sciex 5600 tripleTOF)	(131)
NADA et OLDA	Cerveau de souris	SPE et « Column switching »	Colonne 1 : Phase stationnaire Poroshell 120 EC-C18 : A. Eau + 5mM de formiate d'ammonium + 0,1% d'acide formique B. Acétonitrile + 0,1% d'acide formique (avec une élution isocratique) Colonne 2 : Phase stationnaire Poroshell 120 EC-C18 : A. Eau + 5mM de formiate d'ammonium + 0,1% d'acide formique B. Acétonitrile + 0,1% d'acide formique (avec une élution en gradient)	« Column switching » UPLC-MS/MS (Agilent 6460 triple-quadrupole MS-MS)	(132)
1-AG, 2-AG et AEA, NAE,	Plasma	LLE	Phase stationnaire Zorbax C18	LC-MS/MS (triple-	(133)

NAGly, NASer			A. Eau + acide formique 0,1% B. Acétonitrile 90% + Isopropanol 10% + acide formique 0,1%	quadrupole mass spectrometer TSQ Vantage, Thermo Fisher Scientific)	
AEA, 2-AG, PEA et OEA	Culture cellulaire	LLE	Phase stationnaire Multospher 120 C18 A. Eau + acide formique 0,2% B. Acétonitrile 60% + Isopropanol 40% + acide formique 0,2%	HPLC-MS/MS (Micromass Quatro Micro API mass spectrometer, Waters)	(134)
AEA, LEA, 2-AG, DHEA, OEA, PEA, progesterone, SEA, testosterone, cortisol, AA, PGE2, THB B2	Plasma	Précipitation protéique + SPE	Phase stationnaire Reprosil-PUR C18 A. Eau + 2mM acétate d'ammonium + acide formique 0,1% B. Méthanol + 2mM acétate d'ammonium	HPLC-MS/MS (API 4000 Qtrap mass spectrometer, AB Sciex)	(135)
Oxylipides et endocannabinoïdes (AEA, 2-AG, PEA, OEA, DEA, NAGly, EPEA, DHEA, POEA, LEA, SEA)	Plasma, Tissus d'abats, Cultures cellulaire, Lait	SPE	Phase stationnaire BEH C18 A. Eau + acide acétique 0,1% B. Acétonitrile 90% + isopropanol 10%	UPLC-MS/MS (API 6490 triple quadripole, PE Sciex)	(136,137)
2-AG, AEA, OEA, PEA	Tissu hépatique et les adiposites	SPE	Phase stationnaire Kinetex LC C18 A. 75% méthanol + 24,9% de l'eau + 0,1% d'acide acétique B. Méthanol + 0,1% d'acide acétique	UPLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap, ThermoFisher Scientific)	(138)
AEA, O-AEA	Plasma	«Salting-out assisted liquid-liquid extraction» (SALLE)	Phase stationnaire Poroshell 120 SB-C18 • 65% Eau + 35% acétonitrile + 0,1% acide formique (élution isocratique)	UPLC-MS/MS (API-5500 Qtrap, Applied Biosystems)	(139)
AEA et 2-AG	Plasma et tissu aortique	LLE, SPE et SLE	Phase stationnaire Kinetex C18 A. Eau + 0,2% d'acide acétique B. Acétonitrile + 0,1% d'acide formique	UPLC-MS (Shimadzu IT-TOF)	(140)
AEA, 2-AG, 1-AG, LEA et PEA	Plasma des ours noir de Virginie (Etats Unis)	LLE et « Column switching »	Colonne 1 : Phase stationnaire Atlantis-dC18 : A. Eau + 0,1% d'acide formique B. Acétonitrile + 0,1% d'acide formique Colonne 2 : Phase stationnaire BEH C18 : A. Eau + 0,1% d'acide formique B. Acétonitrile + 0,1% d'acide formique	HPLC-MS/MS (XEVO TQ-S, Waters)	(141)

AEA, 2-AG et les glucocorticoïdes	Cheveux	SPE	Phase stationnaire Dikma ODS C18 <ul style="list-style-type: none"> <li>10% Eau + 90% Méthanol + 2mM d'acétate d'ammonium + 0,1% acide formique (Elution isocratique)</li> </ul>	HPLC-MS/MS (Qtrap Applied Biosystem)	(142)
AEA et 2-AG	Plasma	« Column switching »	Colonne 1 : Phase stationnaire RP-8 ADS <ul style="list-style-type: none"> <li>L'eau (Elution isocratique)</li> </ul> Colonne 2 : Phase stationnaire Kinetex C18 <ul style="list-style-type: none"> <li>30% Eau + 70% acétonitrile + 0,5% acide formique (Elution isocratique)</li> </ul>	HPLC-MS/MS (XEVO TQ-D, Waters)	(143)
AEA, PEA, OEA, 2-AG	Sérum et fluide folliculaire	MLME avec une dérivatisation chimique	Phase stationnaire BEH C18 <p>A. Eau + 0,1% d'acide formique</p> <p>B. Acétonitrile</p>	UPLC-MS/MS (Shimadzu 8040 triple quadripole)	(144)
AEA, DEA, DHEA, NADA, DGLEA, 2AG, 2-AGE, LEA, O-AEA, SEA, OEA, PEA	Cellules souches foetales	LLE	Phase stationnaire Agilent Polaris-HR-Chip 3 C18 : <p>A. Eau + 10 mM d'acide formique</p> <p>B. Acétonitrile</p>	UPLC-MS/MS (Agilent 6460 triple quadripole MS)	(135)
SEA, DHEA, STEARDA, DEA, 2-AG, 2-AGE, AEA, NAGly, OEA, PEA, O-AEA	Serum	SPE	Phase stationnaire Poroshell 120 EC-18: <p>A. Eau + 0,1% d'acide formique</p> <p>B. Acétonitrile</p>	UPLC-MS/MS (Agilent 6410 triple quadripole)	(145)
Dosage de 24 endocannabinoïdes, endocannabinoïde-like et leurs précurseurs phospholipidiques	Plasma	LLE	Phase stationnaire Kinetex Core Shell C18 <p>A. 65% Eau + 35% 2-propanol + 0,05% d'acide acétique</p> <p>B. Acetonitrile + 0,05% d'acide formique</p>	UPLC-MS/MS (API Qtrap, AB Sciex)	(146)
AA, DHA, EPA, AEA, PEA, OEA, DHEA, EPEA, EEA, 2-AG, PG, 2-OG, DHG, EPG, EG	Lait	SPE	Phase stationnaire Agilent Zorbax SB-CN C18 <p>A. Eau + 10mM d'acétate d'ammonium</p> <p>B. Méthanol</p>	UPLC-MS/MS (TSQ Quantum Ultra triple quadripole, Thermo Electron)	(147)
AEA, PEA, 2-AG, OEA	Plasma	LLE	Phase stationnaire BEH C18 <p>A. Eau + 0,0025% d'acide formique</p> <p>B. Acétonitrile + 0,0025% d'acide formique</p>	UPLC-MS/MS (Qtrap 6500+, Sciex)	(148)
AEA, 2AG, OEA, cortisol, progestérone	Plasma, salive	LLE (plasma) et précipitation	Phase stationnaire BEH C18 <p>A. Eau + 2mM d'acétate d'ammonium (pH 4,5)</p>	UPLC – MS/MS (XEVO TQ, Waters)	(149)

		protéique (salive)	B. Acétonitrile		
AEA, 2-AG, 1-AG, PEA, OEA et SEA	Cheveux	SLE avec l'extraction en ligne	Phase stationnaire de SPE online (Chromolith®Speed ROD RP-18 <sup>e</sup> ) Phase stationnaire de colonne (Shim-pack XR-ODS LC column) A. Méthanol B. Eau + 2 mM d'acétate d'ammonium	UPLC-MS/MS (Qtrap 6500, AB Sciex)	(150)
AEA, 1-AG, aldosterone, 11-DHC, estradiol, androstenedione, DHT, cortisol, testosterone, progesterone	Plasma et les poils des souris	SPE (plasma) et SLE (poils)	Phase stationnaire : Platisil ODS C18 : • Méthanol 90% + eau 10% + 2mM d'acétate d'ammonium (pH 4,5)	UPLC – MS/MS (Qtrap 3200, Sciex)	(151)

## A-1 Endocannabinoïdes

### A-1.1 Structure et chimie des endocannabinoïdes

Les structures et les données de solubilité des molécules endocannabinoïdes sont présentées dans les Figure 2, Figure 4, et le tableau 2 (152). Les quatre molécules sont solubles dans l'éthanol (153).

**Tableau 2 : Données des masses exactes et des coefficients de partage. Source : « Chempider » (153)**

Molécule	Masses exactes (masses molaires) (g/mol)	Coefficient de partage entre octanol/eau (expérimental)
AEA	347,2824	7,43
2-AG	378,2770	7,28
PEA	299,2824	6,65
OEA	325,2980	7,27

### A-1.2 Concentrations sanguines des endocannabinoïdes

La mise en oeuvre du dosage plasmatique des endocannabinoïdes nécessite la prise en compte des particularités intrinsèques de chaque molécule. En premier lieu, les concentrations sanguines usuelles compilées à partir de 15 études cliniques différentes (154) vont

- de 0,2 à 5,0 µg/L pour AEA,
- de 1,2 à 53 µg/L pour OEA,
- de 1,4 à 125 µg/L pour PEA
- et de 0,6 à 15 µg/L pour 2-AG.

Ces concentrations ont été mesurées dans le plasma et le sérum, et peuvent être biaisées par l'effet de la matrice ainsi que les différentes méthodes de traitement pré-analytique des échantillons. Ainsi, les données disponibles concernant les concentrations de 2-AG ne précisent pas si les mesures ont été réalisées sur le pic chromatographique du 2-AG seul, ou si les mesures ont été faites avec la somme de 2 pics (2-AG et 1-AG).

### **A-1.3 Particularités d'ionisation en fonction du tampon utilisé dans la phase mobile de chromatographie**

Le tampon utilisé en CL-SM/SM joue un rôle important dans l'ionisation des molécules et donc sur les masses (exactes ou nominales) des molécules rapportées à leur charge électrique. La désolvatation dans l'électrospray permet d'obtenir les ions désolvatés, par exemple  $[MH]^+$  ;  $[MH]^-$  ;  $[MNa]^+$  ;  $[MK]^+$ . Les ions chargés positivement ou négativement sont recherchés en fonction du type d'ionisation choisie (positive ou négative).

L'ensemble des molécules endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like auxquelles nous nous sommes intéressées dans ce travail ont une meilleure réponse dans l'ionisation positive en formant 3 ions majoritaires :  $[MH]^+$ ,  $[MNa]^+$ ,  $[MK]^+$  (125). L'ensemble des données bibliographiques disponibles indiquent un choix préférentiel sur l'utilisation d'ion  $[MH]^+$ .

Zoerner *et al.* rapportent une particularité d'ionisation en fonction du tampon dans la phase mobile utilisée pour le dosage de 2-AG et 1-AG. Leur étude rapporte une prévalence de formation d'adduit  $[MNa]^+$  par rapport aux  $[MH]^+$  et  $[MK]^+$  avec l'utilisation de formiate d'ammonium comme tampon de phase mobile. Cet ion moléculaire possède une stabilité élevée et ne peut pas être fragmenté sur l'intervalle d'énergie de collision testé entre 0 et 120 eV. Ainsi, l'utilisation de l'acétate d'ammonium à 2 mM est alors proposée par les auteurs car elle permet de changer l'équilibre de formation des ions vers  $[MH]^+$  pouvant être fragmentés à une énergie de collision de 15 eV sur l'appareil XEVO TQ-MS™ (Waters) (125).

### **A-1.4 Problèmes des isomères**

#### **A-1.4.1 Isomérisation *in vitro* de 2-AG vers 1-AG**

Le 2-AG représente un élément essentiel dans le système endocannabinoïde et c'est l'endocannabinoïde le plus abondant dans le SNC. L'isomérisation spontanée *in vitro* par une migration de groupement acyle de 2-AG vers 1-AG, composé inactif (155) est bien connue. Cette isomérisation (Figure 7 : Isomérisation *in vitro* du 2-AG vers le 1-AG. est provoquée et influencée par les différents solvants organiques utilisés dans les méthodes d'extraction en phase liquide, la présence de sérum albumine dans l'échantillon, des hautes valeurs de pH et la température élevée lors de préparation pré-analytique des échantillons (125,156). En prenant en compte cette

particularité, certains auteurs préconisent l'évaluation des concentrations sanguines de 2-AG en utilisant la somme des réponses de 2-AG et 1-AG (157).

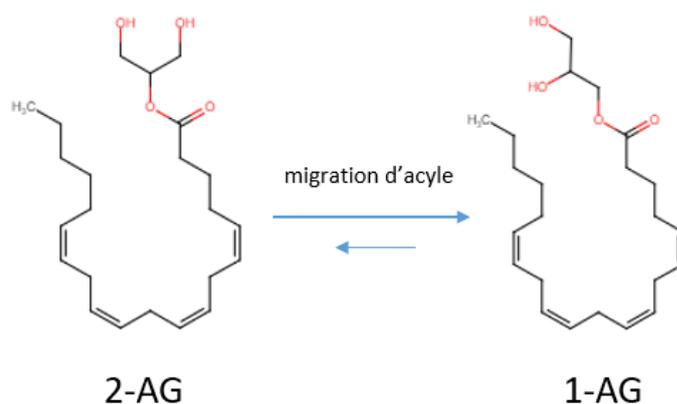
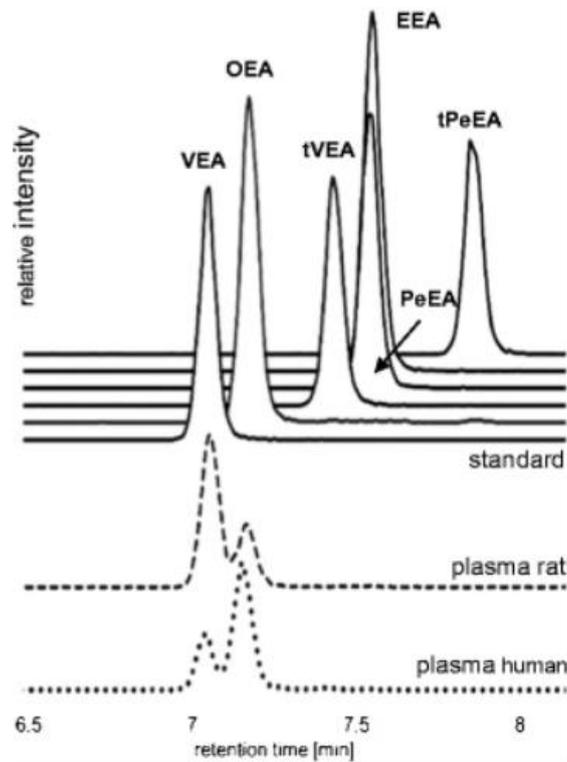


Figure 7 : Isomérisation *in vitro* du 2-AG vers le 1-AG.

#### A-1.4.2 Co-élution des isomères d'OEA

La difficulté de dosage d'OEA réside dans l'existence de molécules interférentes ne pouvant pas être discriminées par la seule spectrométrie de masse. Les études récentes démontrent que les molécules suivantes peuvent correspondre à un isomère de OEA : l'éthanolamide cis-vaccénique (VEA), l'éthanolamide élaïdique (EEA), l'éthanolamide trans-vaccénique (tVEA), l'éthanolamide pétroselinique (PeEA) et l'éthanolamide trans-pétroselinique (t-PeEA) (Figure 8) (158).



**Figure 8 : Séparation entre l'OEA et ses isomères : l'éthanolamide cis-vaccénique (VEA), l'éthanolamide élaïdique (EEA), l'éthanolamide trans-vaccénique (tVEA), l'éthanolamide pétroselinique (PeEA) et l'éthanolamide trans-pétroselinique (t-PeEA) (158).**

Le VEA représente un problème majeur avec le dosage de l'OEA en raison de la concentration similaire de cette molécule et de celle de l'OEA dans les échantillons biologiques. Le fait que le VEA soit un isomère d'OEA implique qu'il possède la même masse d'ions moléculaires  $[MH]^+$  et le même spectre de fragmentation qu'OEA. La discrimination de ces 2 molécules ne peut être réalisée que par une séparation chromatographique (146,148,158). Röhrig *et al.* proposent 2 possibilités de séparation entre OEA et VEA en chromatographie liquide :

- L'utilisation de gradient lent (Tableau 3) entre 2 phases mobiles : (A) eau avec 0,1% d'acide formique et (B) l'acétonitrile avec une utilisation de colonne Kinetex® Core Shell C18 UHPLC column (Phenomenex) 1,7  $\mu$ m, 150 x 2,1 mm. (158).

**Tableau 3 : Gradient de séparation de l'OEA et de ses isomères (VEA, tVEA, EEA, PeEA, et tPeEA) avec en (A) eau avec 0,1% d'acide formique, et en (B) l'acétonitrile avec le débit à 0,5 mL/min, selon Röhrig et al. (158).**

Temps (min)	Pourcentage de phase A	Pourcentage de phase B (%)
0	45	55
8,0	20	80
8,1	0	100
11,9	0	100
12,0	45	55
15,0	45	55

- L'utilisation de gradient lent (Tableau 4) entre 2 phases mobiles (A) 65% d'eau, 35% de 2-propanol et 0,05 % d'acide acétique et (B) l'acétonitrile et 0,05 % d'acide acétique avec une utilisation de colonne Kinetex® Core Shell C18 UHPLC column (Phenomenex) 1,7 µm, 150 x 2,1 mm. (146).

**Tableau 4 : Gradient permettant la séparation d'OEA et ses isomères (VEA, tVEA, EEA, PeEA et tPeEA) avec en (A) 65% d'eau, 35% 2-propanol et 0,05 % d'acide acétique, et en (B) l'acétonitrile et 0,05 % d'acide acétique avec le débit à 0,25 mL/min, selon Röhrig et al. (146).**

Temps (min)	Pourcentage de phase A (%)	Pourcentage de phase B (%)
0	55	45
1	55	45
19	30	70
24	10	90
24,5	0	100

Néanmoins, la séparation chromatographique complète (résolution supérieure à 95%) des pics d'OEA et de VEA n'a pas été totalement démontrée avec ces 2 méthodes.

#### **A-1.4.3 Co-élution d'un isomère de l'AEA**

La mise en place d'une méthode de dosage d'AEA nécessite la prise en compte de l'existence d'un isomère de l'AEA, l'O-arachidonoyl éthanolamine (O-AEA ou virodhamine) ne pouvant pas être discriminé par la spectrométrie de masse, mais l'étant par la séparation chromatographique. La virodhamine, découverte et décrite pour la première fois en 2002 (Figure 9), possède des propriétés d'antagoniste partiel des récepteurs CB1 et d'agoniste complet des récepteurs CB2 (159). La séparation de ces deux molécules ne présente pas une grande difficulté analytique en chromatographie liquide en phase inverse avec l'utilisation d'une colonne C18 compte tenu de l'affinité moins importante de l'O-AEA pour la phase stationnaire par

rapport à l'AEA. La séparation de l'AEA et de l'O-AEA est alors réalisable en élution isocratique ou en mode gradient.

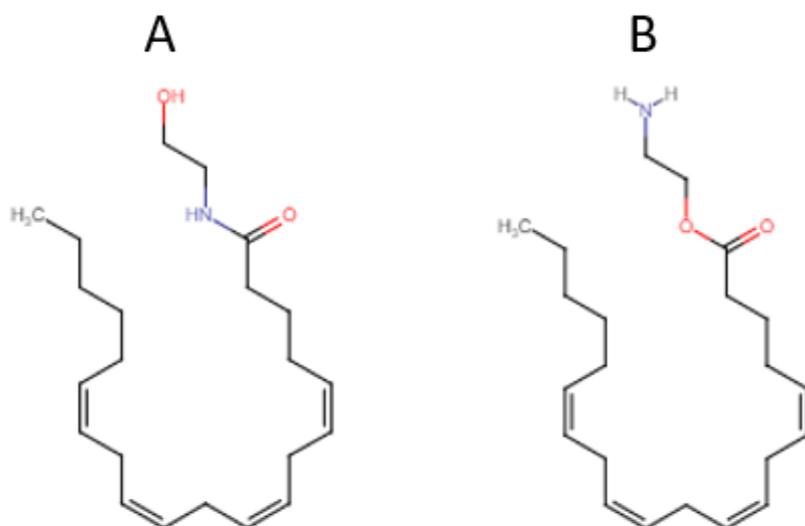


Figure 9 : Formule développée de AEA (A) et son isomère O-AEA (B)

### A-1.5 Endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like dans les éléments figurés du sang et influence de la vitesse de centrifugation

La vitesse de centrifugation est un paramètre crucial dans l'activation plaquettaire (160). Il a été démontré que l'augmentation de la vitesse de centrifugation peut influencer sur une libération de 1-AG et 2-AG dans le plasma (161). Gurke *et al.* démontrent une augmentation des concentrations de ces 2 molécules proportionnellement à la vitesse de centrifugation, laissant supposer que l'activation plaquettaire influe sur la méthode de dosage (Figure 10) (148).

### A-1.6 Stabilité

#### A-1.6.1 Stabilité du 2-AG et du 1-AG

Il a été démontré une faible stabilité du 2-AG et de son isomère 1-AG à température ambiante et à 4°C dans le sang total, avec une diminution, à court terme, des concentrations sanguines. La même étude réalisée dans le plasma a démontré une augmentation significative des concentrations en 2-AG et 1-AG à température ambiante (Figure 10). L'augmentation des concentrations de 1-AG est supérieure à celle de 2-AG et ne peut pas être expliquée par une transformation de 2-AG vers 1-AG *in vitro*. En conséquence, le dosage de 2-AG avec l'utilisation de la somme de 2-AG et 1-AG est critiquable (148). L'isomérisation significative en 1-AG est observée

également dans les échantillons plasmatiques gardées à  $-80^{\circ}\text{C}$  après 20 jours de stockage (155). Compte tenu des données de stabilité, il est théoriquement possible que l'acheminement rapide des échantillons dans la glace puisse stabiliser les concentrations de ces 2 molécules dans l'échantillon.

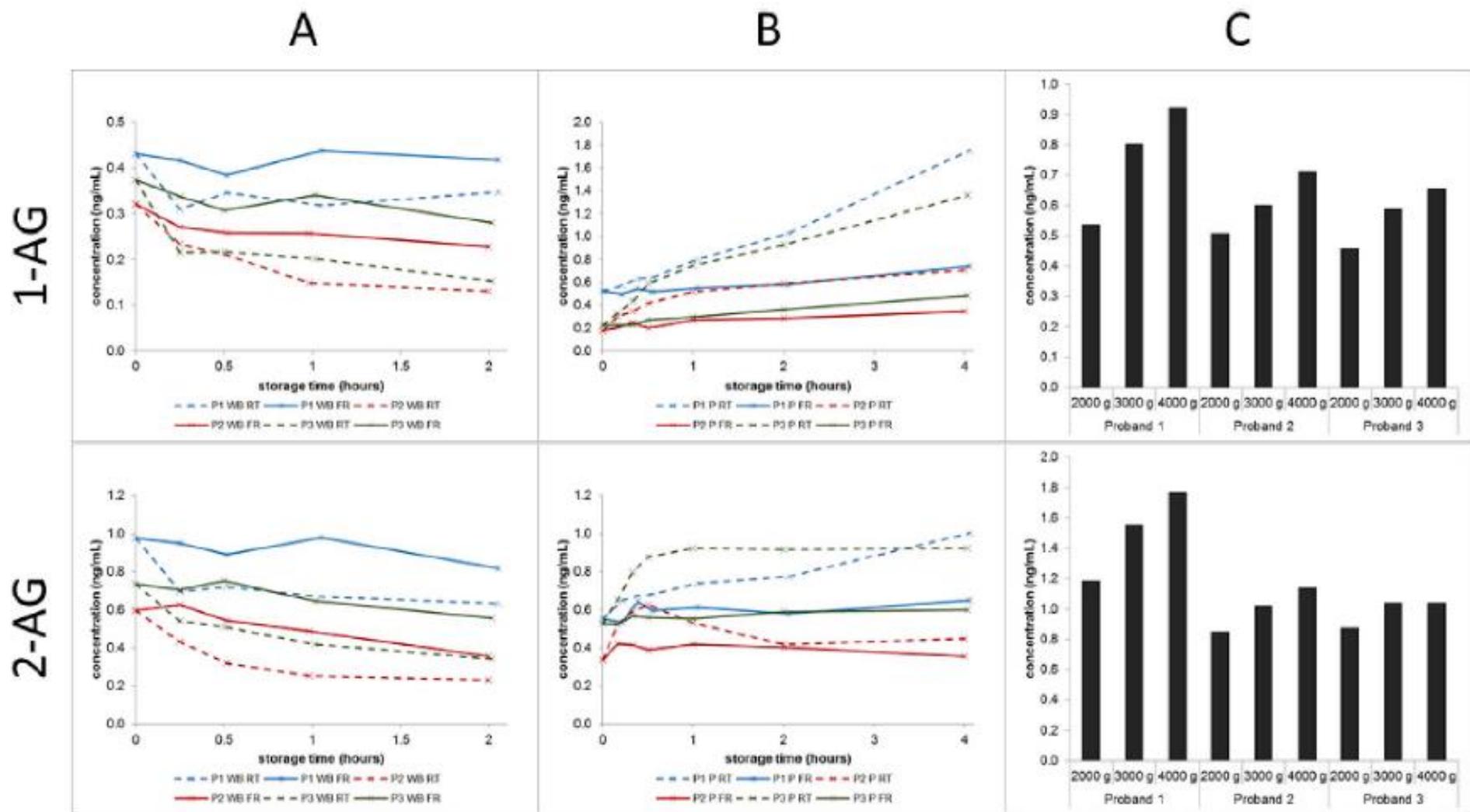


Figure 10 : Stabilité du 2-AG et du 1-AG : (A) stabilité dans le sang total et (B) et le plasma de 3 échantillons (P1 ;P2 ;P3) à température ambiante (RT) et à 4°C (RF), et (C) variation en fonction de la vitesse de centrifugation, selon Gurke *et al.* (148);

### **A-1.6.2 Stabilité de l'AEA, du PEA et de l'OEA dans le sang total et le plasma**

La stabilité des molécules endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like a été étudiée dans plusieurs publications. Il a été démontré une augmentation des concentrations d'AEA, de PEA et d'OEA en fonction du temps dans les échantillons sanguins, pouvant être expliquée par une libération à partir des cellules sanguines (Figure 11) (148,162). Gurke *et al.* ont démontré une augmentation significative de ces 3 molécules dans le sang total lors d'une étude de stabilité menée sur 3 échantillons. Il a été également démontré une augmentation des concentrations à la température ambiante et à 4°C. Aucune augmentation ou dégradation n'a été observée dans le plasma, ainsi que l'absence d'influence de la vitesse de centrifugation sur les concentrations. Certains auteurs proposent l'utilisation de phénylméthylsulfonyl hydrolase (PMSF) comme un inhibiteur non spécifique de la FAAH et de la MAGL pour prévenir la dégradation des endocannabinoïdes (148,163). L'autre moyen de prévenir la dégradation de ces molécules est la conservation de longue durée des échantillons biologiques à -80°C.

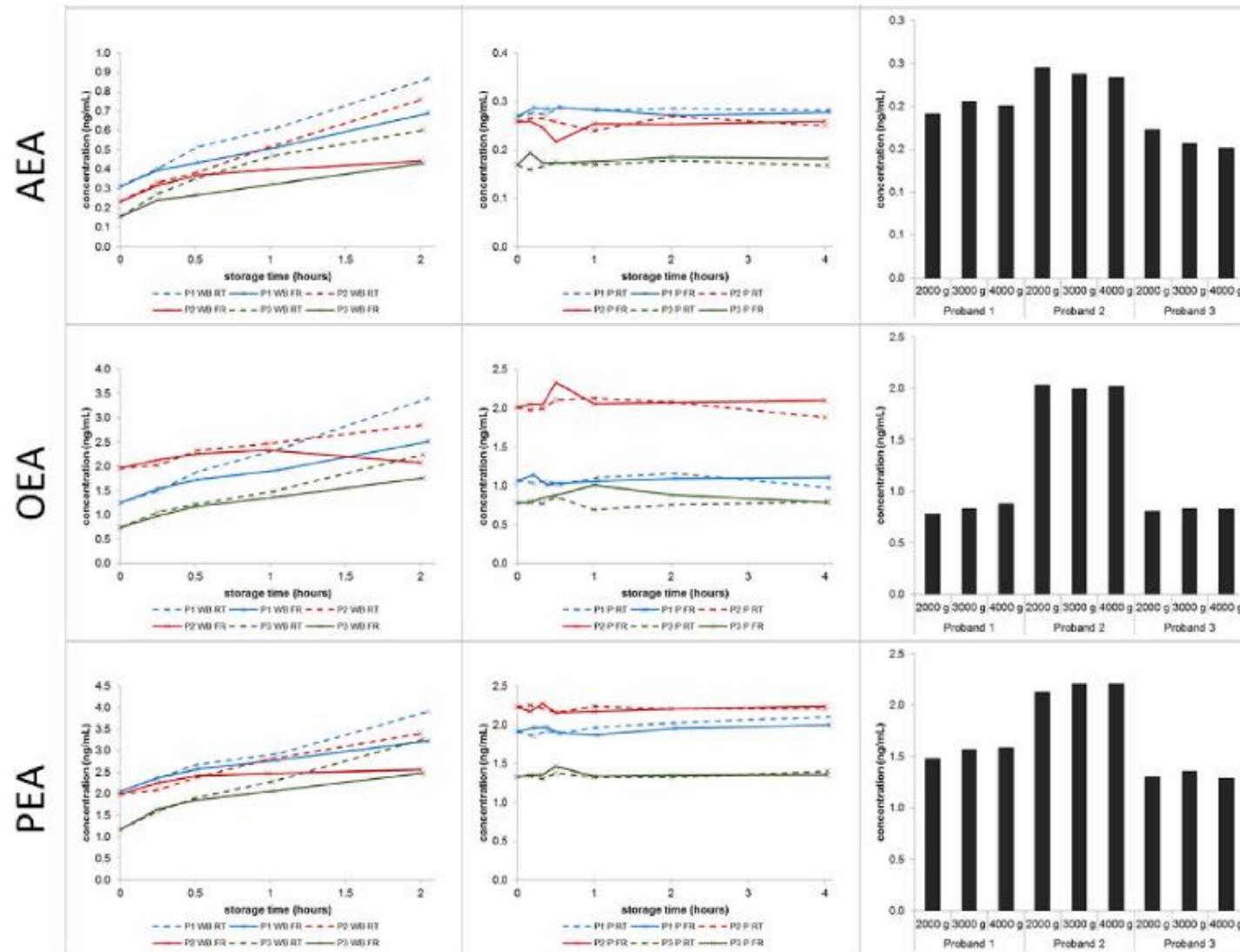


Figure 11 : Stabilité de l'AEA, du PEA et de l'OEA. (A) stabilité dans le sang total et (B) du plasma de 3 échantillons (P1 ;P2 ;P3) à la température ambiante (RT) et à 4°C dans le réfrigérateur (RF) (C) variation en fonction de la vitesse de centrifugation, selon Gurke *et al.* (148).

### **A-1.7 Contamination de PEA et OEA**

Enfin, un autre problème décrit pour le PEA et l'OEA est la présence d'un signal important dans le blanc d'échantillon (sans ajout d'étalon interne et sans les molécules). La présence de ce signal peut être expliquée par l'OEA et le PEA eux-mêmes, ou par un contaminant, autre que ces 2 molécules, utilisé dans le traitement du matériel et possédant des propriétés chimiques similaires. L'étude menée pour déterminer la provenance de cette contamination a démontré la présence de PEA dans la verrerie utilisée dans la méthode pré-analytique, notamment dans les pipettes Pasteur en verre (154). Cette interférence ne peut pas être éliminée et doit être prise en compte. La conséquence, lors de la mise en place de méthode le signal observé dans le blanc pour PEA et OEA doit être pris en compte (148).

## ***A-2 Méthodes de préparation des échantillons***

### **A-2.1 Introduction**

Différentes méthodes de prétraitement des échantillons sont rapportées dans la littérature (120) :

1. Des méthodes « conventionnelles » :
  - a. La simple précipitation protéique
  - b. L'extraction liquide-liquide (LLE)
  - c. L'extraction en phase solide (SPE)
2. De « nouvelles » méthodes d'extraction :
  - a. L'utilisation d'une deuxième colonne de purification (column-switching LC- MS/MS)
  - b. La micro-SPE
  - c. La microextraction par liquide magnétique (MLME)

### **A-2.2 Les méthodes de prétraitement conventionnelles**

#### **A-2.2.1 Précipitation protéique**

La méthode de précipitation protéique avec les solvants organiques (notamment l'acétonitrile) des échantillons biologiques représente l'approche la plus simple de

prétraitement des échantillons (126,164). L'utilisation des solvants organiques miscibles dans l'eau telle que l'acétonitrile et le méthanol permet la déshydratation des surfaces protéiques. Ces surfaces protéiques déshydratées sont capables de s'associer par les forces de Van der Waals en des particules de tailles élevées (défini par les champs de cisaillement) qui vont précipiter. La technique de précipitation par l'acétonitrile est réalisée à basse température pour prévenir la dénaturation protéique qui est favorisée par les températures élevées. Ce phénomène est expliqué par le fait que l'hydratation des groupements non polaires des protéines est thermodynamiquement favorable (165). La précipitation protéique est donc une approche non sélective. Les phospholipides sont solubles dans les solvants organiques provoquant la majoration de l'effet de suppression d'ions et la saturation de la phase stationnaire de colonne. Les phospholipides affectent constamment la performance analytique chromatographique et la détection par la spectrométrie de masse (120,166).

### **A-2.2.2 Extraction liquide-liquide**

La méthode d'extraction liquide-liquide (LLE) avec les solvants organiques non miscibles à l'eau pour le dosage des endocannabinoïdes est basée sur les propriétés lipophiles de ces molécules. Les différents solvants utilisés sont principalement le chloroforme, le toluène, le mélange de chloroforme et de méthanol et l'acétate d'éthyle/hexane (111). L'évaluation de la LLE doit, ici, intégrer la possibilité d'utiliser différents solvants, une évaluation de l'effet de matrice, le pourcentage d'isomérisation du 2-AG vers le 1-AG et la stabilité de 2-AG dans les échantillons plasmatiques. L'effet de matrice a été évalué avec les mesures des concentrations de phospholipides extraits après LLE par des dosages en CL-SM/SM en ionisation négative, selon une liste de phospholipides proposée par Xia *et al.* (167). La littérature montre que les pourcentages d'extraction avec le toluène, l'éthyle acétate/isoheptane 1:1, l'éthyle acétate, et l'éthyle acétate heptane 1:9 sont de l'ordre de 70 à 80% pour le 2-AG et de 60 à 70 % pour l'AEA (111). La LLE avec le toluène et la solution d'acétate d'éthyle/isoheptane démontre les meilleurs résultats sur l'effet de matrice (avec 2% pour le toluène et 5% pour l'acétate d'éthyle/isoheptane 1:1) et, pour le toluène, un plus faible pourcentage d'isomérisation du 2-AG vers le 1-AG. (125).

Une des variantes de l'extraction liquide-liquide est une extraction liquide-liquide avec l'utilisation de mélange des sels (*Salting-out assisted liquid-liquid extraction* :

SALLE) (magnésium sulfate, acétate d'ammonium, sulfate de zinc et chlorite de calcium) avec les solvants organiques miscibles dans l'eau (acétonitrile, acétone, acétate d'éthyle et isopropanol). L'utilisation de ces sels permet et/ou améliore la séparation des phases (168). Selon les données disponibles, ce type d'extraction permet de gagner en rapidité, est moins nocif pour l'environnement et présente un coût de revient plus faible qu'avec les autres méthodes d'extraction par LLE (120).

### **A-2.2.3 L'extraction en phase solide**

A l'heure actuelle, l'extraction en phase solide (SPE) a démontré une grande sélectivité par rapport à la précipitation protéique ou la LLE. Les SPE avec phase stationnaire inverse sont de plus en plus utilisées à l'heure actuelle.

Le principe de la SPE est l'adsorption sur la phase stationnaire (présent dans une cartouche) des molécules à extraire, suivi d'une élution de ces composés d'intérêt. L'utilisation de phase stationnaire de type C18 permet la séparation des endocannabinoïdes et des molécules interférentes, et donc, de diminuer le bruit de fond ainsi que l'effet de suppression des ions au niveau du spectromètre de masse. L'autre possibilité d'utilisation de la SPE est la rétention spécifique des phospholipides sur la phase stationnaire des cartouches.

Néanmoins, la méthode utilisant la SPE demeure assez complexe avec plusieurs étapes (conditionnement, un ou des lavages et une élution) et augmente le coût d'analyse.

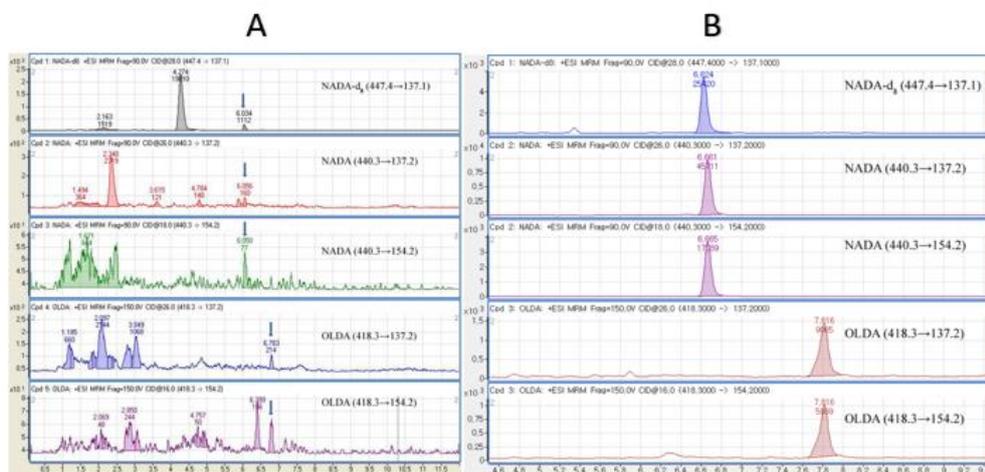
## **A-2.3 Nouvelles méthodes d'extraction**

Les nouvelles techniques de détection développées ont permis de minimiser les étapes de préparation des échantillons biologiques ainsi que le temps nécessaire à l'extraction (169).

### **A-2.3.1 Utilisation d'une seconde colonne de purification (« column switching »)**

La méthode de « column switching » en CL-SM/SM pour le dosage des endocannabinoïdes a été décrite par Ji D. *et al.* avec la mise en place d'une méthode de dosage du NADA et de l'OLDA dans le cerveau de rats (132). La méthode présentée décrit l'utilisation d'une méthode de SPE avec une phase stationnaire C8 et de deux colonnes de séparation chromatographique en phase inverse C18 avec

l'élution en mode isocratique sur la première colonne et une élution en gradient sur la seconde colonne (Tableau 1). Les résultats des chromatogrammes montrent une augmentation significative de signal par une diminution du bruit de fond des molécules lipophiles (Figure 12). Une autre méthode sur la base de « column-switching » en micro-flow pour le dosage d'AEA, de 2-AG, de 1-AG, de PEA et de LEA a été développée par Kirkwood *et al.* dans le plasma des ours noirs (avec utilisation de la LLE et de 2 colonnes en méthode « column-switching ») (141).



**Figure 12 : Chromatogrammes sans méthode de « column-switching » (A) et avec une méthode de « column-switching » (B), selon Ji,D *et al.* A sensitive and accurate quantitative method to determine N-arachidonoyldopamine and N-oleoyldopamine in the mouse striatum using column-switching LC-MS-MS: use of a surrogate matrix to quantify endogenous compounds. *Anal Bioanal Chem* 2014 (117).**

### A-2.3.2 Micro-SPE

Les méthodes utilisant la  $\mu$ -SPE consistent en l'utilisation d'embouts de pipettes avec une phase stationnaire inverse C18 à l'intérieur. Cette méthode a été décrite par M. Sergi *et al.* : elle est couplée avec une précipitation protéique préalable pour le dosage de l'AEA et du 2-AG. Les molécules d'intérêt sont retenues sur la phase stationnaire de l'embout de pipette, puis sont éluées avec une solution de méthanol contenant 10 mM d'acide formique (127). Les méthodes à la base de la  $\mu$ -SPE permettent de minimiser le temps de préparation des échantillons par rapport aux méthodes utilisant la SPE conventionnelle (120).

### A-2.3.3 Micro-extraction par liquide magnétique

Une innovation des dernières années en technique d'extraction est la micro-extraction par liquide magnétique (MLME) qui utilise des liquides magnétiques à base de nanoparticules de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. L'utilisation de ces nanoparticules diluées dans le toluène permet une adsorption physique des molécules de toluène et offre alors la

possibilité d'effectuer une extraction liquide – liquide (Figure 13). Après la désorption des molécules du mélange magnétique de toluène, une étape de dérivation avec du 4-DMABC est proposée pour augmenter la sensibilité. Selon les auteurs, cette méthode permet : une extraction rapide, des résultats de quantification fiables, une prévention de l'isomérisation du 2-AG vers le 1-AG et une amélioration considérable de la sensibilité avec des limites de quantification de 2,7 ng/L pour l'AEA et 20 ng/L pour le 2-AG (144).

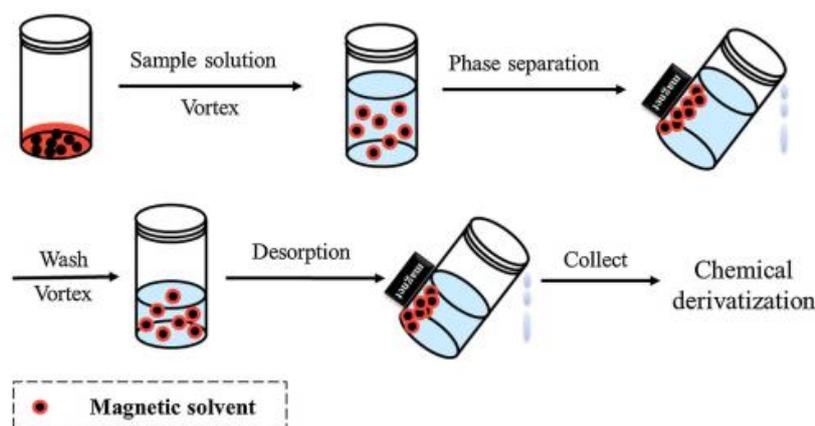


Figure 13 : Schéma des étapes de la micro-extraction par liquide magnétique (MLME), selon Ding *et al.* *Investigation of changes in endocannabinoids and N-acylethanolamides in biofluids, and their correlations with female infertility. J Chromatogr A 2017 (129).*

## B- Développement de la méthode de dosage

### B-1 Préanalytique

#### B-1.1 Choix de la matrice et des anticoagulants

Le 2-AG et le 1-AG sont présents dans les plaquettes et peuvent être libérés à la suite d'une activation plaquettaire. Cela nécessite l'utilisation d'un anticoagulant dans les tubes de prélèvement permettant d'empêcher la formation de caillots et l'activation plaquettaire. La majorité des publications retrouvées dans la littérature préconisent l'utilisation de l'EDTA et la majorité des études de stabilité ont été effectuées avec cet anticoagulant. De ce fait, le tube choisi pour la réalisation du prélèvement sanguin est le BD Vacutainer® K2E (EDTA) REF. 367864.

L'utilisation du plasma par rapport au sang total a été privilégiée car elle permet une comparabilité avec les données de la littérature. Les deux autres justifications du choix du plasma comme matrice sont :

1. l'effet de matrice moins important dans le plasma par rapport au sang total,
2. la présence des endocannabinoïdes dans les éléments figurés du sang.

Le délai entre le prélèvement et l'étape de centrifugation doit être le plus court possible. L'augmentation des concentrations sanguines en AEA, PEA et OEA stockés à température ambiante nécessite idéalement une centrifugation dans un délai de 30 minutes et un acheminement du prélèvement à basse température, notamment dans la glace.

La libération de 2-AG et de 1-AG à partir des plaquettes peut être influencée par la vitesse de centrifugation et nécessite la standardisation de cette vitesse avec l'utilisation de vitesses basses. La vitesse choisie est de 2000 G pendant 10 minutes à 4°C. La température de centrifugation à 4°C par rapport à la température ambiante est justifiée par une dégradation du 2-AG et une libération de l'AEA, du PEA et de l'OEA moins importantes à basses températures.

Enfin, les échantillons de plasma sont stockés à -80°C jusqu'à la réalisation de l'analyse.

## **B-1.2 Extraction**

Le choix, parmi les méthodes d'extraction, s'est orienté vers les méthodes classiques d'extraction : la précipitation protéique, la LLE, et la SPE. Ce choix est expliqué par le fait que les nouvelles méthodes sont difficiles à mettre en place avec les outils utilisés en routine biologique et en raison de leur coût important. C'est le cas du « column-switching », des méthodes de  $\mu$ SPE et de la MLME.

Parmi les méthodes classiques, les tests sur la précipitation protéique n'ont pas donné de résultats satisfaisants du fait d'un effet de matrice important et d'une perte drastique de sensibilité. Le choix de l'utilisation de la SPE n'a pas été retenu compte tenu du coût et du nombre important d'étapes pré-analytiques.

L'extraction liquide-liquide a finalement été choisie avec l'utilisation du toluène comme solvant. La quantification a été évaluée en fonction de la réponse des molécules deutérées disponibles : le 2-AG-D<sub>5</sub> et le PEA-D<sub>4</sub> (Tableau 5).

**Tableau 5 : Etalon interne utilisé pour chaque molécule**

Molécule	Etalon interne
AEA	PEA-D <sub>4</sub>
OEA	PEA-D <sub>4</sub>
PEA	PEA-D <sub>4</sub>
2-AG/1-AG	2-AG-D <sub>5</sub>

### B-1.3 Préparation des gammes et des contrôles

Les poudres des standards sont diluées dans le méthanol. Les solutions méthanoliques sont stockées à -80°C. La matrice de substitution choisie pour préparer les points de calibration et les contrôles est le tampon phosphate salin (PBS). Ce choix est guidé par les données bibliographiques : il s'agit de la matrice de substitution la plus utilisée. Le tableau 6 présente une synthèse de préparation des gammes et des contrôles.

**Tableau 6 : Préparation des gammes et des contrôles**

	Solutions de travail (µg/L)	Volume de la solution de travail utilisé (µL)	Volume de PBS utilisé (µL)	Concentration relative dans l'échantillon (µg/L)		
				AEA	2-AG/1-AG	OEA et PEA
Blanc	0	20	100	0	0	0
Calibrant 1	0,5	20	100	0,1		
Calibrant 2	1	20	100	0,2	0,2	
Calibrant 3	2,5	20	100	0,5	0,5	0,5
Calibrant 4	5	20	100	1	1	1
Calibrant 5	10	20	100	2	2	2
Calibrant 6	25	20	100	5	5	5
Calibrant 7	50	20	100	10	10	10
Calibrant 8	75	20	100	15	15	15
Contrôle niveau 1	1 et 5	20	100	0,2	0,2	1
Contrôle niveau 2	25	20	100	5	5	5
Contrôle niveau 3	50	20	100	10	10	10

### B -1.4 Protocole préanalytique

Dans le volume de 100 µL d'échantillon plasmatique est ajouté 20 µL de solution d'étalon interne à la concentration de 50 µg/L. Le mélange obtenu est « vortexé » durant 15 secondes et 800 µL de toluène sont ajoutés. Après une homogénéisation par retournement durant 10 minutes, les échantillons sont centrifugés à 14000 G pendant 14 minutes à 4°C. Par la suite, 750 µL de surnageant sont récupérés et

séchés à température ambiante sous un flux d'azote. La récupération du résidu sec s'effectue avec 50 µL de méthanol. La Figure 14 représente le protocole d'extraction définitif.

- 100 µL PBS ou plasma + 20 µL IS
- Vortexer
- 800 µL de toluène
- Homogénéisation pendant 10 minutes
- Centrifugation à 14000 G pendant 14 minutes à 4°C
- Récupération 750 µL de surnageant
- Séchage du surnageant sous l'azote
- Récupération avec 50 µL de Méthanol
- Injection de 10 µL dans l'appareil

**Figure 14 : Protocole d'extraction**

## ***B-2 Chromatographie***

Ce développement chromatographique a été mené compte tenu des données bibliographiques disponibles, des propriétés physico-chimiques et des faibles concentrations.

Le choix final s'est porté sur une chromatographie liquide de type UPLC en phase inverse avec une colonne Kinetex® 2,6 µm 100A C18 (Phénomenex) d'une longueur de 15 cm et d'un diamètre de 2,1 mm. Le choix de cette colonne s'est justifié par une séparation adaptée des molécules et des isomères, ainsi que par une sensibilité maximale pour le 2-AG. Les pics chromatographiques sont représentés dans la Figure 15.

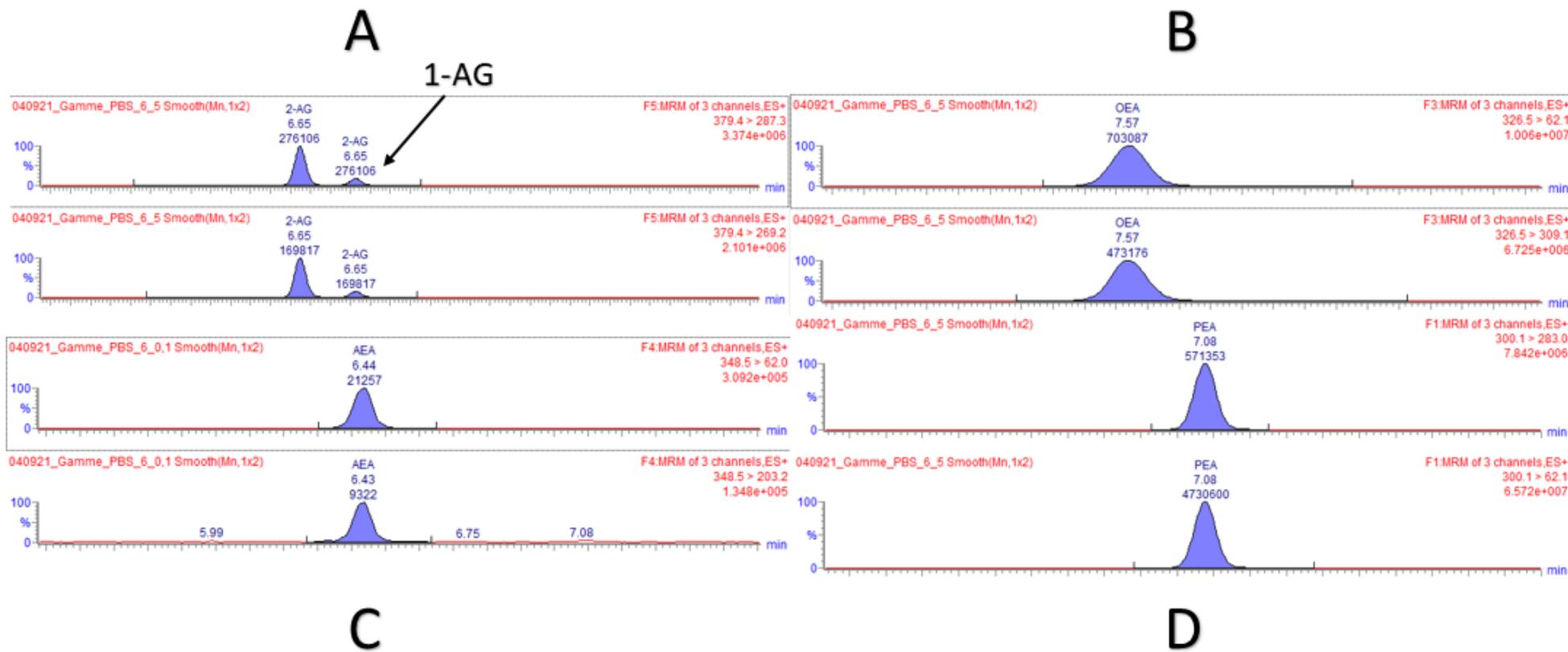


Figure 15 : Pics chromatographiques dans le PBS de 2-AG/1-AG (A), OEA (B), AEA (C), PEA (D)

Le choix des phases mobiles a été adapté en fonction des particularités d'ionisation des molécules vis-à-vis des tampons utilisés. Les meilleures séparations et sensibilités ont été obtenues avec :

- en phase mobile A : de l'eau (MiliQ) avec 2 mM d'acétate d'ammonium et 0,1 % d'acide formique (pH 2,8) ;
- en phase mobile B : du méthanol absolu de qualité UPLC.

Le choix du gradient s'est porté vers l'utilisation d'un gradient lent permettant une meilleure séparation des isomères. Le gradient chromatographique est rapporté dans le Tableau 7.

**Tableau 7 : Gradient des phases mobiles**

<b>Temps (min)</b>	<b>Pourcentage de phase A (%)</b>	<b>Pourcentage de phase B (%)</b>
0	90	10
1	20	80
8,5	8	92
9,5	0	100
11	0	100
12	90	10

Le débit des phases est de 0,3 mL/min et la température de la colonne de 25°C. Le volume d'extrait injecté dans l'appareil est de 10 µL.

La mise en place d'une méthode de dosage de l'AEA, du 2-AG et de l'OEA nécessite la séparation chromatographique des molécules (et isomères) ne pouvant pas être discriminés par la spectrométrie de masse. Les résultats finaux de séparation sont rapportés dans le tableau 8. La séparation avec une résolution supérieure à 95% a été effectuée pour l'AEA et l'O-AEA, le 2-AG et le 1-AG. La séparation partielle a été effectuée entre l'OEA et le VEA. L'impossibilité de séparation complète des 2 pics dans la méthode multiparamétrique est expliquée par la baisse de sensibilité observée pour le 2-AG en diminuant la vitesse de changement de gradient (Tableau 8).

**Tableau 8 : Séparation des isomères**

Substance	Temps de rétention (min)
AEA	6,44
O-AEA	3,63
OEA	7,57
VEA	7,30
2-AG	6,65
1-AG	6,88

### **B-3 La spectrométrie de masse**

La détection est réalisée par un triple-quadrupôle en tandem XEVO® TQ-S (Waters, USA) en mode électrospray positif (ES+). Les conditions optimales déterminées pour l'ensemble des molécules sont les suivantes : tension du capillaire : 1 kV ; température de la source : 150 °C ; débit de cône gaz : 50 L/h ; température et débit de gaz de désolvatation : 650 °C, 1 000 L/h. Le débit de gaz de collision à 0,15 mL/min. Le retraitement des données a été effectué par un logiciel MassLynx® (Waters, USA).

Les données sur le temps de rétention et les transitions utilisées présentées dans le Tableau 9.

**Tableau 9 : Temps de rétention et les transitions MRM utilisées**

Substance	Voltage du cône d'échantillonneur (V)	Temps de rétention (min)	Masse de l'ion moléculaire [MH] <sup>+</sup>	[MH] <sup>+</sup> fragments (énergie de collision eV)
AEA	20	6,44	348,4	62,1 (16) 287,3 (14) 203,2 (16)
OEA	60	7,57	326,4	62,0 (30) 69,2 (30) 80,9 (12)
PEA	60	6,94	300,4	62,1 (12) 283,2 (12) 95,0 (12)
PEA-D <sub>4</sub>	60	6,94	304,3	62,2 (16) 287,3 (14) 48,1 (14)
2-AG / 1-AG	30	6,65	379,3	287,1 (16) 269,3 (14) 89,0 (16)
2-AG-D <sub>5</sub>	30	6,65	384,2	287,1 (18) 269,1 (18) 203,2 (16)

## **B-4 Validation de méthode**

La validation d'une méthode en bioanalyse comprend à une succession d'étapes ayant pour but de démontrer que la méthode utilisée permet de quantifier, avec une précision/certitude maîtrisée, un analyte dans une matrice donnée pour une application précise.

Différents paramètres permettent de définir l'acceptation d'une méthode analytique : la linéarité, la sélectivité, la justesse, la fidélité, la répétabilité, la reproductibilité, le rendement d'extraction, l'accord entre les matrices, la contamination et la stabilité (dans le sang total prélevé et plasma centrifugé). La validation de méthode a été réalisée selon les recommandations COFRAC pour la Norme NF EN ISO 15189.

La spécificité, la sensibilité, la linéarité, la précision, les limites de détection et les limites de quantification ont été définies, dans la validation de méthode, avec un seuil d'acceptabilité du coefficient de variation (CV) à 15 %.

$$CV (\%) = \frac{ET}{M} \times 100$$

Avec : (M) la moyenne et (ET) l'écart-type

### **B-4.1 Concentrations cibles**

Les concentrations des quatre ligands du système endocannabinoïde sont extrêmement variables selon les auteurs. Le choix de la gamme de travail présentée dans le Tableau 6 pour chaque molécule est basé sur l'étude de R Angelini *et al.* (154).

### **B-4.2 L'effet de matrice**

La vérification de l'effet de matrice et la vérification de l'accord entre les matrices ont été réalisées par une comparaison des pentes de calibration. Cette étape a consisté en la préparation de 5 gammes dans une matrice de substitution (PBS) et une matrice de dosage (plasma). Il fallait ensuite comparer la pente des deux droites. La différence des coefficients directeurs déterminés est inférieure de 15%. Cela signifie que la matrice n'a pas un effet significatif sur l'analyse et que le PBS peut être utilisé comme matrice de substitution.

## B-4.3 Robustesse de la méthode

La robustesse d'une méthode est un ensemble de paramètres vérifiés au moment du développement, pouvant estimer ou "chiffrer" les performances de la méthode.

### B-4.3.1 Linéarité et limites

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. Six gammes d'étalonnage ont été réalisées au cours de 6 jours (une gamme par jour). Les critères d'acceptabilité ont été définis à 15% pour chaque point et à 20% pour la limite de quantification et le R – carré, devant être supérieur à 0,99.

Des essais de différentes régressions pour chaque molécule ont été effectués, et la régression finalement retenue se présente sous la forme d'une droite d'équation :

$$y = Ax + B$$

Avec : B : ordonnée à l'origine ; A : pente ; y : signal ; x : concentration

Les résultats ont permis de confirmer la linéarité des gammes sur le domaine de mesure, et de déterminer des limites de détection (LOD), des limites basses de quantification (LOQ) et limites hautes de quantification (ULOQ) de la méthode (Tableau 10).

**Tableau 10 : Limites de détection et de quantification de la méthode [LOD : limite de détection, LOQ : limite basse de quantification, ULOQ : limite haute de quantification]**

Molécule	LOD/LOQ (µg/L)	ULOQ (µg/L)
AEA	0,1	15
OEA	0,5	15
PEA	0,5	15
2-AG/1-AG	0,2	15

### B-4.3.2 Contamination

Cette étape prévoit d'estimer le risque de contamination "inter-échantillon", c'est-à-dire le risque qu'un échantillon de concentration très élevée puisse contaminer

l'échantillon de très faible concentration qui passerait juste après dans la série. Nous avons réalisé :

- 3 points à 15 µg/L et 3 points à 0,2 µg/L pour AEA et 2-AG,
- 3 points à 15 µg/L et 3 points à 1 µg/L pour PEA et OEA.

L'étude de la contamination n'a pas rapporté de contamination significative après le passage d'une concentration élevée.

L'autre point important est la présence d'interférence pour OEA et PEA nécessitant d'être prise en compte lors du traitement des gammes d'échantillon. Néanmoins, le signal interférent est négligeable par rapport au signal de LOQ de ces 2 molécules.

### **B-4.3.3 Fidélité**

La fidélité est le reflet de l'accord entre le résultat obtenu et la concentration réelle de l'échantillon. Elle est notamment caractérisée par la répétabilité et la justesse de la mesure :

- Une mesure répétable va donner des résultats très proches les uns des autres sur des mesures successives.
- Une mesure juste va faire en sorte que la moyenne des valeurs rendues sur des mesures successives soit proche de la valeur théorique.

Les résultats rapportent la fidélité de la méthode avec une justesse et un coefficient de variation inférieure à 15%.

## **B – 4.4 Le rendement d'extraction**

L'utilisation de la méthode extraction LLE nécessite de faire une évaluation du rendement d'extraction. Il correspond au rapport des signaux mesurés, d'une part après le traitement de l'échantillon chargé avec une quantité connue, et d'autre part après l'injection directe dans le système analytique d'une solution de référence contenant une quantité équivalente de substance à analyser.

La validation de méthode analytique a été réalisée en 7 jours successifs, avec les résultats présentés dans le Tableau 11.

**Tableau 11 : Tableau de la validation de méthode analytique (sans stabilité) [CV : coefficient de variation ; R<sup>2</sup> : R-carré ; CQI : contrôle qualité interne]**

	AEA	OEA	PEA	2-AG/1-AG
<b>Rang de calibration et linéarité</b>				
<b>Gamme de</b>	6	6	6	6
<b>Moyenne pente (a)</b>	0,958	0,613	3,550	1,422
<b>CV (%)</b>	6,4	3,2	9,0	3,7
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99452	0,99976	0,99699	0,99628
<b>Accord entre les matrices (Plasma)</b>				
<b>Effectif</b>	5	5	5	5
<b>Moyenne pente dans plasma</b>	1,071	0,566	3,35	1,435
<b>CV (%)</b>	6,1	7,662	5,2	11,2
<b>Ecart entre les pentes (%)</b>	11,71	-7,66	-3,5	1,97
<b>Rendement d'extraction</b>				
<b>0,5 µg/L</b>				
<i>Effectif</i>	5	5	5	5
Moyenne (µg/L)	80,3	41,4	41,8	64,3
CV (%)	12,8	10,5	14,4	10,0
<b>5 µg/L</b>				
<i>Effectif</i>	5	5	5	5
Moyenne (µg/L)	65,0	57,2	60,8	54,5
CV (%)	6,1	9,6	2,5	4,3
<b>10 µg/L</b>				
<i>Effectif</i>	5	5	5	5
Moyenne (µg/L)	70,3	64,1	70,3	73,8
CV (%)	3,4	3,5	2,0	3,8
<b>Fidélité</b>				
<b>Répétabilité</b>				
<b>CQI bas</b>	<b>0,2 µg/L</b>	<b>1 µg/L</b>	<b>1 µg/L</b>	<b>0,2 µg/L</b>
<i>Effectif</i>	6	6	6	6
Moyenne (µg/L)	0,19	0,92	0,92	0,22
CV (%)	3	7	4	3
Biais (%)	-3	-8	-8	10
<b>CQI intermédiaire</b>	<b>5 µg/L</b>	<b>5 µg/L</b>	<b>5 µg/L</b>	<b>5 µg/L</b>
<i>Effectif</i>	6	6	6	6
Moyenne (µg/L)	4,73	5,46	5,21	5,30
CV (%)	3	4	4	1
Biais (%)	-5	9	4	6
<b>CQI haut</b>	<b>10 µg/L</b>	<b>10 µg/L</b>	<b>10 µg/L</b>	<b>10 µg/L</b>
<i>Effectif</i>	6	6	6	6
Biais (µg/L)	9,41	9,82	9,69	10,16
CV (%)	5	5	5	1
Justesse (%)	-6	2	-3	2
<b>Reproductibilité</b>				
<b>CQI bas</b>	<b>0,2 µg/L</b>	<b>1 µg/L</b>	<b>1 µg/L</b>	<b>0,2 µg/L</b>
<i>Effectif</i>	6	6	6	6
Moyenne (µg/l)	0,21	1,02	1,06	0,22
CV (%)	9	13	11	13
Biais (%)	4	2	6	8
<b>CQI intermédiaire</b>	<b>5 µg/L</b>	<b>5 µg/L</b>	<b>5 µg/L</b>	<b>5 µg/L</b>
<i>Effectif</i>	6	6	6	6
Moyenne (µg/l)	4,99	5,26	5,55	5,02
CV (%)	12	13	9	2
Biais (%)	0	5	11	0
<b>CQI haut</b>	<b>10 µg/L</b>	<b>10 µg/L</b>	<b>10 µg/L</b>	<b>10 µg/L</b>
<i>Effectif</i>	6	6	6	6
Moyenne (µg/l)	10,35	10,67	10,56	9,96
CV (%)	13	12	2	4
Biais (%)	3	7	6	0

## B-4.5 La stabilité

L'évaluation de la stabilité des endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like est un élément crucial dans la mise en place de la méthode de dosage. Cette stabilité doit être évaluée dans le sang total (cf délai entre le prélèvement et la centrifugation) ainsi que dans le plasma pour évaluer l'influence de la température sur la dégradation des molécules.

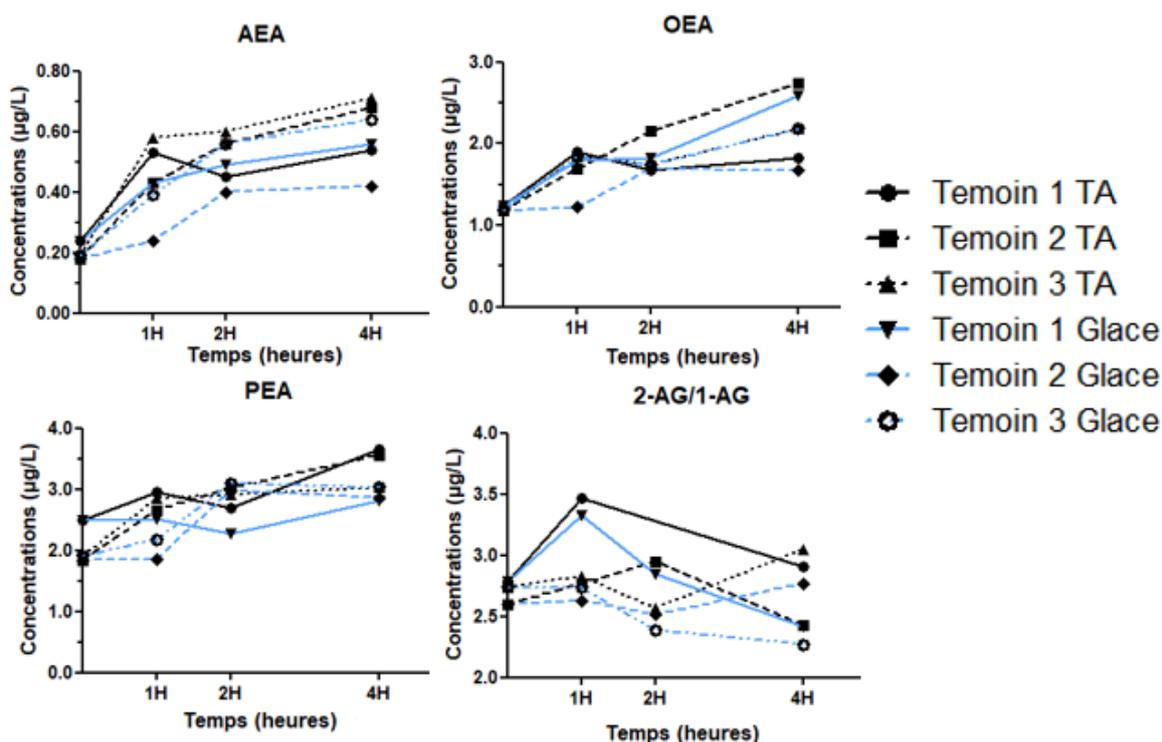


Figure 16 : Stabilité dans le sang total (tube EDTA) à température ambiante (TA) et dans la glace (Glace) réalisée sur 3 témoins sains.

Les données (Figure 16) obtenues démontrent une augmentation très rapide de l'AEA, de l'OEA et du PEA dans le sang total. Cette augmentation précédemment décrite dans la littérature a été précédemment détaillée [cf. A-1.6.2 Stabilité de l'AEA, du PEA et de l'OEA dans le sang total et le plasma]. Ce relargage est ralenti avec une conservation dans la glace mais ne peut pas être totalement arrêté. Les variations des concentrations de 2-AG et de 1-AG peuvent être expliquées par une fluctuation de l'isomérisation *in vitro* du 2-AG vers le 1-AG. La vérification de la formation de caillot dans le tube a montré que les deux échantillons « Témoin 1 » ont été coagulés ; ceci peut expliquer l'augmentation des concentrations de 2-AG/1AG à la suite d'un relargage de ces molécules à partir des plaquettes. Ces résultats prouvent la nécessité d'une centrifugation rapide de l'échantillon après le

prélèvement (dans un délai de moins d'une heure) et l'envoi dans la glace de l'échantillon.

Cette observation, intéressante, de l'augmentation du taux de 2-AG/1-AG dans l'échantillon « coagulé » doit être évaluée lors de prochains essais.

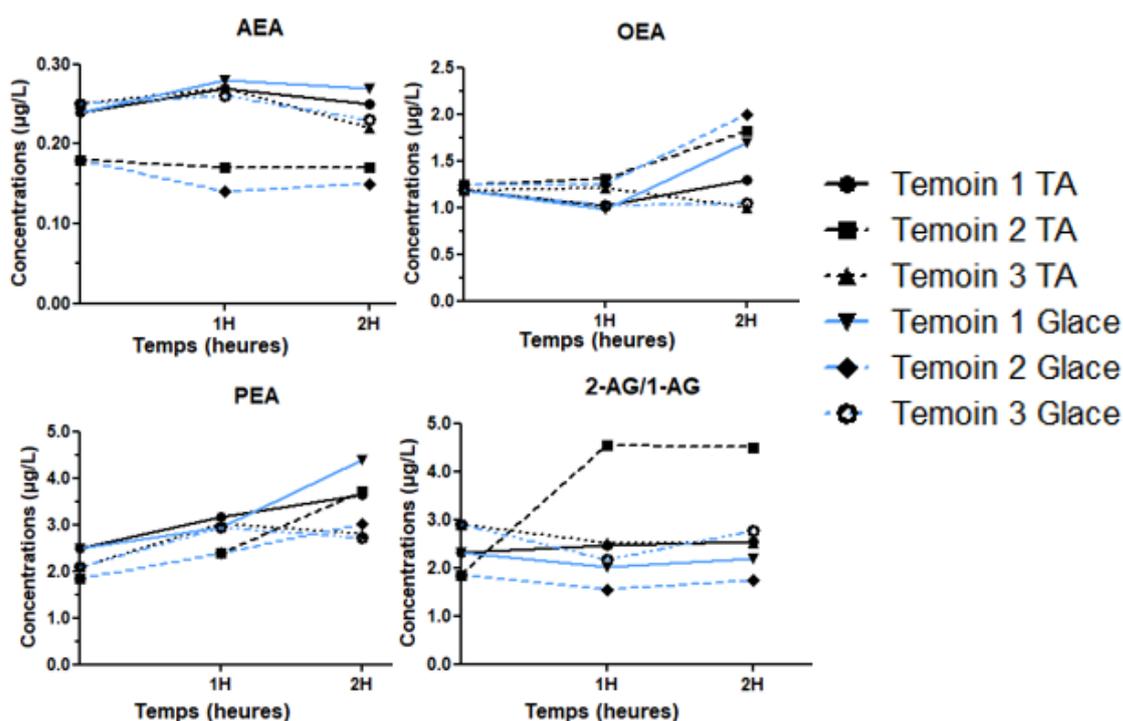


Figure 17 : Stabilité dans le plasma à température ambiante (TA) et dans la glace (Glacé) réalisée avec 3 témoins sains.

L'évaluation de la stabilité des ligands endocannabinoïdes dans le plasma (Figure 17) a démontré une augmentation significative ( $CV > 15\%$ ) des concentrations d'OEA et de PEA dans les deux heures après la décongélation. Ainsi, un traitement rapide des échantillons après leur décongélation dans le délai d'une heure est nécessaire.

L'évaluation de la stabilité dans le plasma du 2-AG démontre une stabilité pendant 2 heures des 5 échantillons dans les 2 conditions. L'augmentation de la concentration dans l'échantillon « Témoin 2 » à température ambiante est probablement liée à un aléa analytique et sera réévalué sur un plus grand nombre d'échantillons.

Le récapitulatif des performances de la méthode analytique est rapporté dans le Tableau 12.



**Tableau 12 : Tableau récapitulatif des performances de la méthode analytique**

	<b>AEA</b>	<b>OEA</b>	<b>PEA</b>	<b>2-AG/1-AG</b>
<b>Domaine de linéarité (µg/L)</b>	0,1 – 15	0,5 – 15	0,5 – 15	0,2 – 15
<b>R – carré (moyen)</b>	0,99452	0,99976	0,99699	0,99628
<b>Limite de détection (µg/L)</b>	0,1	0,5	0,5	0,2
<b>Limite basse de quantification (µg/L)</b>	0,1	0,5	0,5	0,2
<b>Répétabilité (%)</b>	≤ 5	≤ 7	≤ 5	≤ 5
<b>Reproductibilité (%)</b>	≤ 13	≤ 11	≤ 13	≤ 13
<b>Limite haute de quantification (µg/L)</b>	15	15	15	15
<b>Contamination (%)</b>	0	0,29	0,28	0

## Discussion

Le système endocannabinoïde (ou endocannabinoïdome) représente un sujet d'intérêt scientifique majeur à l'heure actuelle. Les nombreuses études menées affirment la complexité majeure de ce système mais aussi son implication large dans des pathologies humaines notamment neurodégénératives, psychiatriques et inflammatoires.

Différentes études ont permis de mettre en évidence une modification des concentrations d'ECs dans diverses pathologies notamment dans les pathologies neurologiques.

Dans la maladie de Parkinson, il est observé d'une part une augmentation des concentrations circulantes d'AEA chez des patients non traités et d'autre part une diminution de ces mêmes concentrations chez des patients recevant un traitement à base de précurseurs de la dopamine et d'agonistes dopaminergiques. Dans une population de patients atteints de Parkinson, l'AEA dans le liquide cébrospinal est situé dans un intervalle de 2,09 à 5,91  $\mu\text{g/L}$ , ce qui paraît plus élevé comparé aux valeurs observées dans la population saine (0,70 à 3,13  $\mu\text{g/L}$ ) (120). L'hypothèse émise est que cette augmentation est indirectement liée aux symptômes de la pathologie (40). Néanmoins avec les études menées dans un modèle murin de maladie de Parkinson (traité par 6-OH-dopamine), l'utilisation des inhibiteurs de MAGL et FAAH a démontré un effet bénéfique via la stimulation du récepteur CB2 avec un effet neuroprotecteur des inhibiteurs de MAGL (170) et via la stimulation du CB1 et/ou CB2 avec un effet sur la motricité par les inhibiteurs de FAAH (171). Un autre effet bénéfique de l'inhibition de FAAH, notamment sur la neuro-inflammation et la neurotoxicité, a été mis en évidence avec une augmentation du PEA, un endocannabinoïde-like, qui exerce son action par une activation de PPAR $\alpha$ . L'autre agoniste direct du PPAR $\alpha$ , l'OEA, possède des effets antidyskinésiques par l'activation du TRPV1 (172,173). Des études cliniques dans la maladie de Parkinson ont été menées avec l'utilisation de CBD, de THC, de nabilone (analogue synthétique du THC) et de PEA, et elles montrent des effets bénéfiques sur la pathologie (40).

Dans la pathologie d'Alzheimer (MA), les modifications du système endocannabinoïde sont directement liées à la progression de la maladie. Dans une

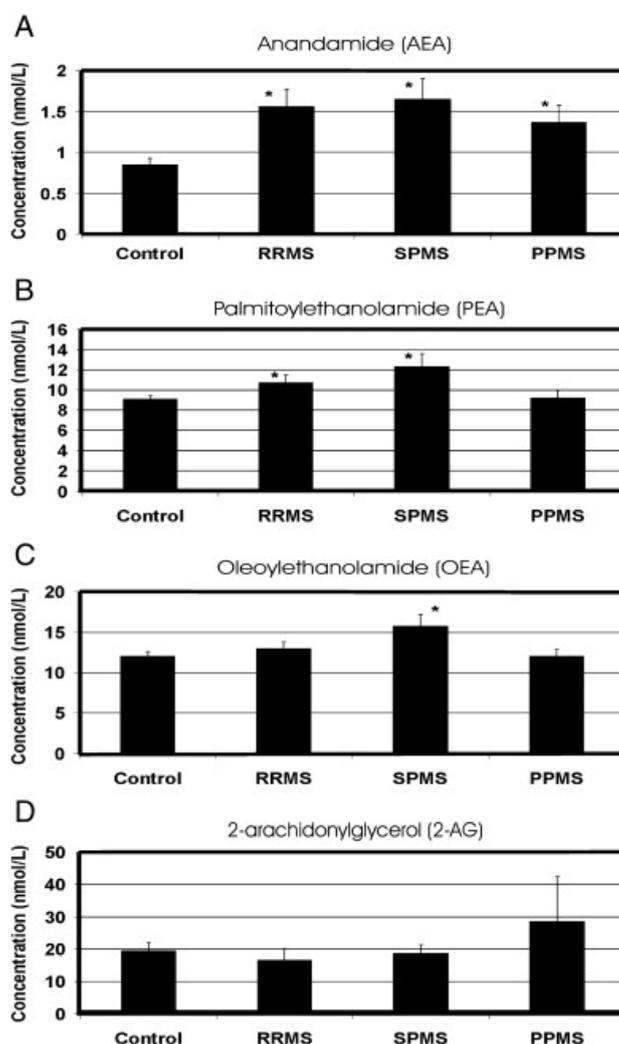
étude *post-mortem* de patients atteints d'Alzheimer, la concentration en anandamide est diminuée dans le cortex frontal et temporal, en corrélation inverse avec l'accumulation de peptide bêta-amyloïde (174). Cette observation est corrélée avec une augmentation de l'expression et de l'activité de FAAH dans les astrocytes et les cellules microgliales (175).

L'autre observation intéressante est une augmentation par le 2-AG de la signalisation au niveau hippocampique avec une augmentation de l'expression de la DAGL (176). Ce changement est corrélé à une augmentation plasmatique de 2-AG (Groupe patients atteints de MA : 5,3 µg/L avec un écart-type +/- 4,8 µg/L ; groupe contrôle : 3,1 µg/L avec un écart-type 2,5 µg/L ; *p-value* 0,02) (177). Les conséquences de l'élévation du 2-AG au niveau cérébral ont été également évaluées dans un modèle murin atteint de la MA (FAD-mice) en présence d'inhibiteur de MAGL. Ces modifications sont en lien avec des propriétés anti-inflammatoires et une diminution de la neurodégénérescence (178). De la même manière que dans la maladie d'Alzheimer, dans la maladie de Parkinson, l'inhibition de la FAAH provoque une augmentation de PEA qui possède des propriétés anti-inflammatoires via l'activation de PPAR $\alpha$  (179).

Dans la maladie de Huntington (MH), une pathologie héréditaire, associée à la destruction des neurones dopaminergiques dans le *globus pallidus* et conduisant à une déficience locomotrice et mentale, les concentrations lymphocytaires en AEA chez un patient atteint de MH sont 6 fois supérieures à celles dans une population lymphocytaire d'un groupe sain (38,2 +/- 12,5 ng/mg de protéine contre 6,3 +/- 1,4 ng/mg de protéine, *p-value* : 0,0006). Cette modification peut être expliquée par une diminution de l'activité de la FAAH dans cette pathologie (180).

Dans la sclérose en plaque, une pathologie inflammatoire chronique du système nerveux central caractérisée par une réponse auto-immune envers la myéline, certaines études démontrent une activité bénéfique de l'activation des récepteurs CB1 et CB2 (40). Jean-Gilles L. *et al.* se sont intéressés à l'impact de cette pathologie sur les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like. Ils ont démontré une augmentation significative de l'AEA dans les trois groupes de patients (« rémittente – progressive », « progressive secondaire » et « progressive primaire »), du PEA dans les groupes « rémittente – progressive » et « progressive secondaire » et de l'OEA dans le groupe « progressive secondaire » (Figure 18) (181). Ces données d'augmentation des

ligands de l'endocannabinoïdome suggèrent une réponse adaptative de l'organisme envers la pathologie (40).



**Figure 18: Niveaux des ECs plasmatique aux différents stades de sclérose en plaque par rapport au groupe de contrôle. [RRMS : « rémittente – progressive » ; SPMS : « progressive secondaire » PPMS : « progressive primaire »] Selon L. Jean-Gilles et al. *Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. J Neurol Sci.* 15 déc 2009 (181).**

Les perturbations des concentrations en endocannabinoïdes ont été démontrées dans de nombreuses autres pathologies neurologiques telles que la sclérose latérale amyotrophique, les lésions cérébrales traumatiques, les accidents vasculaires cérébraux, les crises épileptiques et l'épilepsie (40). Dans la majorité de ces pathologies, les études des variations des ligands du système endocannabinoïde ont été étudiées dans des modèles murins.

La difficulté de la mise en place et de la validation d'une méthode de dosage des endocannabinoïdes et des molécules endocannabinoïdes-like est associée aux particularités physico-chimiques des molécules décrites précédemment. Ces difficultés analytiques impliquent (i) une élaboration des fourchettes physiologiques

usuelles des concentrations, spécifiquement pour chaque matrice, et (ii) de tenir compte du délai entre le prélèvement et la centrifugation ainsi que les conditions d'acheminement. La méthode de dosage élaborée dans ce travail tient compte des connaissances actuelles en termes analytiques. Elle peut, néanmoins, subir un certain nombre de critiques en termes de séparation des isomères, notamment de l'OEA dont la séparation est encore imparfaite.

Une autre question essentielle se pose sur l'interprétation des concentrations en 2-AG et en 1-AG. A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur l'interprétation de la concentration en 2-AG seule, ou tenant compte de son isomère. Dans notre méthode, il a été choisi d'interpréter la concentration en 2-AG en tenant compte de l'isomérisation de cette molécule vers le 1-AG *in-vitro* pouvant être majorée par les étapes pré-analytiques. Il est important de noter qu'il a été démontré que le 1-AG est présent dans la circulation en petite quantité et peut légèrement, théoriquement, surestimer les résultats. En pratique, la comparaison entre les matrices (PBS et Plasma) n'a pas démontré une différence significative (Tableau 11).

L'étude de stabilité des ECs à court terme doit être également élargie sur un plus grand nombre d'échantillons. La stabilité dans le plasma à long terme doit également être évaluée à -20°C et -80°C.

Dans les perspectives d'amélioration de notre méthode de dosage des endocannabinoïdes, figure l'utilisation de la chromatographie en fluide supercritique (SFC) couplée à la spectrométrie de masse. Le principe de cet outil séparatif est l'utilisation de dioxyde de carbone en état fluide comme le constituant principal de la phase mobile. Avec l'utilisation, en gradient, des solvants organiques, cette technique permettrait une meilleure séparation notamment des isomères, par rapport à la chromatographie liquide classique de type UPLC.

## Conclusion

Dans le domaine médical, le système endocannabinoïde (SEC) est un sujet d'actualité pour des raisons scientifiques et médiatiques (cannabis, cannabidiol, ...). Toutefois, la connaissance précise de ses rôles en situation physiologique ou pathologique demeure imparfaite. Au-delà des implications multiples du SEC, cette imperfection de compréhension repose surtout sur la difficulté analytique de son exploration. Les méthodes de dosage des endocannabinoïdes (et endocannabinoïdes-like) sont rares, chronophages et non appliquées en routine pour le moment.

Le travail mené ici a permis de faire une synthèse bibliographique des 10 dernières années sur les méthodes de dosage des ligands endogènes du système endocannabinoïde, et surtout, la mise en place ainsi que la validation d'une méthode d'analyse quantitative par LC-SM/SM.

L'intérêt croissant du monde scientifique pour le SEC justifie ce travail et la place de cette méthode comme un outil important dans les recherches fondamentales et cliniques (diagnostic et suivi) futures.

Enfin, cette méthode analytique a été élaborée en tenant compte de possibles optimisations futures et peut être étendue avec l'ajout des autres molécules endocannabinoïdes ou endocannabinoïdes-like.

## Références

1. Mechoulam R. *Cannabinoids As Therapeutic Agents*. CRC Press; 2019. 292 p.
2. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 1 sept 2006;58(3):389-462.
3. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish | *Journal of the American Chemical Society* [Internet]. [cité 19 mai 2021]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja01062a046>
4. Les niveaux d'usages des drogues illicites en France en 2017 - Tendances 128 - novembre 2018 - OFDT [Internet]. [cité 19 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.ofdt.fr/publications/collections/periodiques/lettre-tendances/les-niveaux-dusages-des-drogues-illicites-en-france-en-2017-tendances-128-novembre-2018/>
5. KINTZ P. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*. Amsterdam: Elsevier; 1998. 719 p. (Option Bio).
6. Whitlow CT, Freedland CS, Porrino LJ. Functional consequences of the repeated administration of Delta9-tetrahydrocannabinol in the rat. *Drug Alcohol Depend.* 20 août 2003;71(2):169-77.
7. Di Marzo V, De Petrocellis L. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr Med Chem.* 2010;17(14):1430-49.
8. Pistis M, Melis M. From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem.* 2010;17(14):1450-67.
9. Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci.* nov 2010;35(11):601-8.
10. Lutz B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* mars 2002;66(2-3):123-42.
11. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* déc 2007;152(7):1092-101.
12. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci.* oct 2009;30(10):515-27.
13. Micale V, Di Marzo V, Sulcova A, Wotjak CT, Drago F. Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. *Pharmacol Ther.* avr 2013;138(1):18-37.
14. Fagan SG, Campbell VA. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. *Br J Pharmacol.* mars 2014;171(6):1347-60.
15. Zhang H-Y, Bi G-H, Li X, Li J, Qu H, Zhang S-J, et al. Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice

- and rats. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. mars 2015;40(4):1037-51.
16. Liu Q-R, Pan C-H, Hishimoto A, Li C-Y, Xi Z-X, Llorente-Berzal A, et al. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav*. juill 2009;8(5):519-30.
  17. Klein TW, Newton CA, Friedman H. Cannabinoids and the immune system. *Pain Res Manag*. 2001;6(2):95-101.
  18. Yang P, Wang L, Xie X-Q. Latest advances in novel cannabinoid CB(2) ligands for drug abuse and their therapeutic potential. *Future Med Chem*. févr 2012;4(2):187-204.
  19. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, et al. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 5 févr 1999;64(2):193-8.
  20. Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 3 nov 2007;362(4):928-34.
  21. Petitet F, Donlan M, Michel A. GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des*. mars 2006;67(3):252-3.
  22. Sharir H, Console-Bram L, Mundy C, Popoff SN, Kapur A, Abood ME. The endocannabinoids anandamide and virodhamine modulate the activity of the candidate cannabinoid receptor GPR55. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol*. déc 2012;7(4):856-65.
  23. Lingerfelt MA, Zhao P, Sharir HP, Hurst DP, Reggio PH, Abood ME. Identification of Crucial Amino Acid Residues Involved in Agonist Signaling at the GPR55 Receptor. *Biochemistry*. 24 janv 2017;56(3):473-86.
  24. Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DEI, Lagerström MC, Schiöth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett*. 20 nov 2003;554(3):381-8.
  25. Chu Z-L, Carroll C, Alfonso J, Gutierrez V, He H, Lucman A, et al. A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology*. mai 2008;149(5):2038-47.
  26. Hansen HS, Rosenkilde MM, Holst JJ, Schwartz TW. GPR119 as a fat sensor. *Trends Pharmacol Sci*. juill 2012;33(7):374-81.
  27. Chen J, Sang Z, Li L, He L, Ma L. Discovery of 5-methyl-2-(4-((4-(methylsulfonyl)benzyl)oxy)phenyl)-4-(piperazin-1-yl)pyrimidine derivatives as novel GRP119 agonists for the treatment of diabetes and obesity. *Mol Divers*. août 2017;21(3):637-54.
  28. Du Q, Liao Q, Chen C, Yang X, Xie R, Xu J. The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Common Diseases of the Digestive Tract and the Cardiovascular and Respiratory System. *Front Physiol*. 2019;10:1064.

29. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011;12(3):218.
30. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 23 oct 1997;389(6653):816-24.
31. Moiseenkova-Bell VY, Stanciu LA, Serysheva II, Tobe BJ, Wensel TG. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 mai 2008;105(21):7451-5.
32. Jordt SE, Ehrlich BE. TRP channels in disease. *Subcell Biochem.* 2007;45:253-71.
33. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* nov 2003;140(5):790-801.
34. Wójtowicz S, Strosznajder AK, Jeżyna M, Strosznajder JB. The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res.* mai 2020;45(5):972-88.
35. Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol.* 11 juill 2005;517(3):174-81.
36. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 18 déc 1992;258(5090):1946-9.
37. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 4 oct 1995;215(1):89-97.
38. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 29 juin 1995;50(1):83-90.
39. Pertwee RG. Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;231:1-37.
40. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* janv 2020;16(1):9-29.
41. Bachur NR, Udenfriend S. Microsomal synthesis of fatty acid amides. *J Biol Chem.* 25 mars 1966;241(6):1308-13.
42. Astarita G, Rourke BC, Andersen JB, Fu J, Kim JH, Bennett AF, et al. Postprandial increase of oleoylethanolamide mobilization in small intestine of the Burmese python (*Python molurus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* mai 2006;290(5):R1407-1412.
43. Borrelli F, Izzo AA. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* févr 2009;23(1):33-49.

44. Ganley OH, Graessle OE, Robinson HJ. Anti-inflammatory activity on compounds obtained from egg yolk, peanut oil, and soybean lecithin. *J Lab Clin Med.* mai 1958;51(5):709-14.
45. Rankin L, Fowler CJ. The Basal Pharmacology of Palmitoylethanolamide. *Int J Mol Sci.* 26 oct 2020;21(21).
46. Murataeva N, Straiker A, Mackie K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol.* mars 2014;171(6):1379-91.
47. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* janv 2009;89(1):309-80.
48. Hansen HH, Hansen SH, Schousboe A, Hansen HS. Determination of the phospholipid precursor of anandamide and other N-acylethanolamine phospholipids before and after sodium azide-induced toxicity in cultured neocortical neurons. *J Neurochem.* août 2000;75(2):861-71.
49. Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem.* 13 févr 2004;279(7):5298-305.
50. Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem.* 21 sept 2001;276(38):35552-7.
51. Tsuboi K, Sun Y-X, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the cholesteryl glycerophosphorylcholine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J Biol Chem.* 25 mars 2005;280(12):11082-92.
52. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 7 nov 1996;384(6604):83-7.
53. Hu SS-J, Mackie K. Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;231:59-93.
54. Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature.* 29 mars 2001;410(6828):588-92.
55. Araque A, Castillo PE, Manzoni OJ, Tonini R. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology.* 15 sept 2017;124:13-24.
56. Vicario-Abejón C, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci.* déc 2002;3(12):965-74.
57. Aso E, Ozaita A, Valdizán EM, Ledent C, Pazos A, Maldonado R, et al. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J Neurochem.* avr 2008;105(2):565-72.
58. Butovsky E, Juknat A, Goncharov I, Elbaz J, Eilam R, Zangen A, et al. In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol. *J Neurochem.* mai 2005;93(4):802-11.

59. Compagnucci C, Di Siena S, Bustamante MB, Di Giacomo D, Di Tommaso M, Maccarrone M, et al. Type-1 (CB1) cannabinoid receptor promotes neuronal differentiation and maturation of neural stem cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e54271.
60. Hill MN, Titterness AK, Morrish AC, Carrier EJ, Lee TT-Y, Gil-Mohapel J, et al. Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus*. avr 2010;20(4):513-23.
61. Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji S-P, Bai G, et al. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest*. nov 2005;115(11):3104-16.
62. Marinelli S, Pacioni S, Bisogno T, Di Marzo V, Prince DA, Huguenard JR, et al. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is responsible for the slow self-inhibition in neocortical interneurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 10 déc 2008;28(50):13532-41.
63. Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):299-325.
64. Tam J, Trembovler V, Di Marzo V, Petrosino S, Leo G, Alexandrovich A, et al. The cannabinoid CB1 receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. janv 2008;22(1):285-94.
65. Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guijarro A, Vacondio F, Duranti A, et al. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci*. oct 2010;13(10):1265-70.
66. Cassano T, Calcagnini S, Pace L, De Marco F, Romano A, Gaetani S. Cannabinoid Receptor 2 Signaling in Neurodegenerative Disorders: From Pathogenesis to a Promising Therapeutic Target. *Front Neurosci*. 2017;11:30.
67. Palazuelos J, Ortega Z, Díaz-Alonso J, Guzmán M, Galve-Roperh I. CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling. *J Biol Chem*. 6 janv 2012;287(2):1198-209.
68. Chung YC, Shin W-H, Baek JY, Cho EJ, Baik HH, Kim SR, et al. CB2 receptor activation prevents glial-derived neurotoxic mediator production, BBB leakage and peripheral immune cell infiltration and rescues dopamine neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Exp Mol Med*. 22 janv 2016;48(1):e205.
69. Edwards JG. TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. *Prog Drug Res Fortschritte Arzneimittelforschung Progres Rech Pharm*. 2014;68:77-104.
70. Villapol S. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. *Cell Mol Neurobiol*. janv 2018;38(1):121-32.
71. Boger DL, Patterson JE, Jin Q. Structural requirements for 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor potentiation by the biologically active lipid oleamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 avr 1998;95(8):4102-7.
72. Fabre LF, McLendon D. The efficacy and safety of nabilone (a synthetic cannabinoid) in the treatment of anxiety. *J Clin Pharmacol*. sept 1981;21(S1):377S-382S.

73. Navarrete F, García-Gutiérrez MS, Jurado-Barba R, Rubio G, Gasparyan A, Austrich-Olivares A, et al. Endocannabinoid System Components as Potential Biomarkers in Psychiatry. *Front Psychiatry*. 2020;11:315.
74. Neumeister A, Normandin MD, Pietrzak RH, Piomelli D, Zheng MQ, Gujarró-Anton A, et al. Elevated brain cannabinoid CB1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study. *Mol Psychiatry*. sept 2013;18(9):1034-40.
75. Jenniches I, Ternes S, Albayram O, Otte DM, Bach K, Bindila L, et al. Anxiety, Stress, and Fear Response in Mice With Reduced Endocannabinoid Levels. *Biol Psychiatry*. 15 mai 2016;79(10):858-68.
76. Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 20 mars 2012;2:e94.
77. De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis*. 19 août 2003;2:5.
78. Desfossés J, Stip E, Bentaleb LA, Lipp O, Chiasson J-P, Furtos A, et al. Plasma Endocannabinoid Alterations in Individuals with Substance Use Disorder are Dependent on the « Mirror Effect » of Schizophrenia. *Front Psychiatry*. 2012;3:85.
79. Basavarajappa BS, Ninan I, Arancio O. Acute ethanol suppresses glutamatergic neurotransmission through endocannabinoids in hippocampal neurons. *J Neurochem*. nov 2008;107(4):1001-13.
80. Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL, Pistis M. Involvement of the endogenous cannabinoid system in the effects of alcohol in the mesolimbic reward circuit: electrophysiological evidence in vivo. *Psychopharmacology (Berl)*. déc 2005;183(3):368-77.
81. Basavarajappa BS. Endocannabinoid System and Alcohol Abuse Disorders. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1162:89-127.
82. González S, Cascio MG, Fernández-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA. Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res*. 1 nov 2002;954(1):73-81.
83. Bystrowska B, Smaga I, Frankowska M, Filip M. Changes in endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain structures following cocaine self-administration and extinction training. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 3 avr 2014;50:1-10.
84. Rivera P, Miguéns M, Coria SM, Rubio L, Higuera-Matas A, Bermúdez-Silva FJ, et al. Cocaine self-administration differentially modulates the expression of endogenous cannabinoid system-related proteins in the hippocampus of Lewis vs. Fischer 344 rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. juill 2013;16(6):1277-93.
85. Palomino A, Pavón F-J, Blanco-Calvo E, Serrano A, Arrabal S, Rivera P, et al. Effects of acute versus repeated cocaine exposure on the expression of endocannabinoid signaling-related proteins in the mouse cerebellum. *Front Integr Neurosci*. 2014;8:22.

86. Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Cuomo V, Astarita G, Fu J, et al. Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 mai 2009;106(19):8027-31.
87. Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther*. avr 2010;126(1):21-38.
88. Piomelli D. A fatty gut feeling. *Trends Endocrinol Metab* TEM. juill 2013;24(7):332-41.
89. Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, et al. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab*. oct 2008;8(4):281-8.
90. Fichna J, Bawa M, Thakur GA, Tichkule R, Makriyannis A, McCafferty D-M, et al. Cannabinoids alleviate experimentally induced intestinal inflammation by acting at central and peripheral receptors. *PloS One*. 2014;9(10):e109115.
91. Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*. oct 2001;134(4):845-52.
92. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. mai 2005;115(5):1298-305.
93. Wu HM, Yang YM, Kim SG. Rimonabant, a cannabinoid receptor type 1 inverse agonist, inhibits hepatocyte lipogenesis by activating liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase axis downstream of Gα i/o inhibition. *Mol Pharmacol*. nov 2011;80(5):859-69.
94. Chanda D, Kim Y-H, Kim D-K, Lee M-W, Lee S-Y, Park T-S, et al. Activation of cannabinoid receptor type 1 (Cbr1) disrupts hepatic insulin receptor signaling via cyclic AMP-response element-binding protein H (Crebh)-mediated induction of Lipin1 gene. *J Biol Chem*. 2 nov 2012;287(45):38041-9.
95. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med*. juin 2006;12(6):671-6.
96. Bátkai S, Járαι Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, et al. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med*. juill 2001;7(7):827-32.
97. Guillot A, Hamdaoui N, Bizy A, Zoltani K, Souktani R, Zafrani E-S, et al. Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver. *Hepatology* Baltim Md. janv 2014;59(1):296-306.
98. Louvet A, Teixeira-Clerc F, Chobert M-N, Deveaux V, Pavoine C, Zimmer A, et al. Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology* Baltim Md. oct 2011;54(4):1217-26.
99. Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, et al. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. juin 2007;21(8):1788-800.

100. Zelber-Sagi S, Azar S, Nemirovski A, Webb M, Halpern Z, Shibolet O, et al. Serum levels of endocannabinoids are independently associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Obes Silver Spring Md.* janv 2017;25(1):94-101.
101. Caraceni P, Viola A, Piscitelli F, Giannone F, Berzigotti A, Cescon M, et al. Circulating and hepatic endocannabinoids and endocannabinoid-related molecules in patients with cirrhosis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* juill 2010;30(6):816-25.
102. Siegmund SV, Uchinami H, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology Baltim Md.* mai 2005;41(5):1085-95.
103. Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology.* août 2010;215(8):588-97.
104. Haskó J, Fazakas C, Molnár J, Nyúl-Tóth Á, Herman H, Hermenean A, et al. CB2 receptor activation inhibits melanoma cell transmigration through the blood-brain barrier. *Int J Mol Sci.* 8 mai 2014;15(5):8063-74.
105. Cencioni MT, Chiurchiù V, Catanzaro G, Borsellino G, Bernardi G, Battistini L, et al. Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors. *PLoS One.* 14 janv 2010;5(1):e8688.
106. Lindborg KA, Teachey MK, Jacob S, Henriksen EJ. Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes Obes Metab.* août 2010;12(8):722-30.
107. Esposito I, Proto MC, Gazerro P, Laezza C, Miele C, Alberobello AT, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant stimulates 2-deoxyglucose uptake in skeletal muscle cells by regulating the expression of phosphatidylinositol-3-kinase. *Mol Pharmacol.* déc 2008;74(6):1678-86.
108. Vettor R, Pagano C. The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* févr 2009;23(1):51-63.
109. Sparling PB, Giuffrida A, Piomelli D, Roszkopf L, Dietrich A. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neuroreport.* 2 déc 2003;14(17):2209-11.
110. Koltyn KF, Brellenthin AG, Cook DB, Sehgal N, Hillard C. Mechanisms of exercise-induced hypoalgesia. *J Pain.* déc 2014;15(12):1294-304.
111. Zoerner AA, Gutzki F-M, Batkai S, May M, Rakers C, Engeli S, et al. Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: a comprehensive review from an analytical and biological perspective. *Biochim Biophys Acta.* nov 2011;1811(11):706-23.
112. Maccarrone M, Attinà M, Cartoni A, Bari M, Finazzi-Agrò A. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of endogenous cannabinoids in healthy and tumoral human brain and human cells in culture. *J Neurochem.* janv 2001;76(2):594-601.
113. Yagen B, Burstein S. Novel and sensitive method for the detection of anandamide by the use of its dansyl derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 31 mars 2000;740(1):93-9.
114. Wang Y, Liu Y, Ito Y, Hashiguchi T, Kitajima I, Yamakuchi M, et al. Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective

- adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxic shock. *Anal Biochem.* 1 juill 2001;294(1):73-82.
115. QTRAP LC-MS/MS Systems [Internet]. [cité 28 mai 2021]. Disponible sur: <https://absciex-prod64.adobecqms.net/products/mass-spectrometers/qtrap-systems.html>
  116. Spectromètre de masse hybride à quadrupôle Orbitrap™ Q Exactive™ UHMR [Internet]. [cité 28 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/0726090>
  117. Richeval C. Thèse de Doctorat de l'Université de Lille, Septembre 2018.
  118. Nicholson JK, Wilson ID. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 1 janv 1989;21(4):449-501.
  119. Trufelli H, Palma P, Famiglini G, Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* juin 2011;30(3):491-509.
  120. Marchioni C, de Souza ID, Acquaro VR, de Souza Crippa JA, Tumas V, Queiroz MEC. Recent advances in LC-MS/MS methods to determine endocannabinoids in biological samples: Application in neurodegenerative diseases. *Anal Chim Acta.* 31 déc 2018;1044:12-28.
  121. Marczylo TH, Lam PMW, Amoako AA, Konje JC. Anandamide levels in human female reproductive tissues: solid-phase extraction and measurement by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 15 mai 2010;400(2):155-62.
  122. Lam PMW, Marczylo TH, El-Talatini M, Finney M, Nallendran V, Taylor AH, et al. Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the measurement of anandamide in human plasma. *Anal Biochem.* 15 sept 2008;380(2):195-201.
  123. Lam PMW, Marczylo TH, Konje JC. Simultaneous measurement of three N-acylethanolamides in human bio-matrices using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* nov 2010;398(5):2089-97.
  124. Lehtonen M, Storvik M, Malinen H, Hyytiä P, Lakso M, Auriola S, et al. Determination of endocannabinoids in nematodes and human brain tissue by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 avr 2011;879(11-12):677-94.
  125. Zoerner AA, Batkai S, Suchy M-T, Gutzki F-M, Engeli S, Jordan J, et al. Simultaneous UPLC-MS/MS quantification of the endocannabinoids 2-arachidonoyl glycerol (2AG), 1-arachidonoyl glycerol (1AG), and anandamide in human plasma: minimization of matrix-effects, 2AG/1AG isomerization and degradation by toluene solvent extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 févr 2012;883-884:161-71.
  126. Balvers MGJ, Wortelboer HM, Witkamp RF, Verhoeckx KCM. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of free and esterified fatty acid N-acyl ethanolamines in plasma and blood cells. *Anal Biochem.* 15 mars 2013;434(2):275-83.

127. Sergi M, Battista N, Montesano C, Curini R, Maccarrone M, Compagnone D. Determination of the two major endocannabinoids in human plasma by  $\mu$ -SPE followed by HPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* janv 2013;405(2-3):785-93.
128. Muguruza C, Lehtonen M, Aaltonen N, Morentin B, Meana JJ, Callado LF. Quantification of endocannabinoids in postmortem brain of schizophrenic subjects. *Schizophr Res.* août 2013;148(1-3):145-50.
129. Thieme U, Schelling G, Hauer D, Greif R, Dame T, Laubender RP, et al. Quantification of anandamide and 2-arachidonoylglycerol plasma levels to examine potential influences of tetrahydrocannabinol application on the endocannabinoid system in humans. *Drug Test Anal.* févr 2014;6(1-2):17-23.
130. Gouveia-Figueira S, Nording ML. Development and validation of a sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of 15 endocannabinoids and related compounds in milk and other biofluids. *Anal Chem.* 21 janv 2014;86(2):1186-95.
131. Ottria R, Ravelli A, Gigli F, Ciuffreda P. Simultaneous ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry quantification of endogenous anandamide and related N-acylethanolamides in bio-matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 mai 2014;958:83-9.
132. Ji D, Jang C-G, Lee S. A sensitive and accurate quantitative method to determine N-arachidonoyldopamine and N-oleoyldopamine in the mouse striatum using column-switching LC-MS-MS: use of a surrogate matrix to quantify endogenous compounds. *Anal Bioanal Chem.* juill 2014;406(18):4491-9.
133. Bilgin M, Bindila L, Graessler J, Shevchenko A. Quantitative profiling of endocannabinoids in lipoproteins by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* juill 2015;407(17):5125-31.
134. Ivanov I, Borchert P, Hinz B. A simple method for simultaneous determination of N-arachidonoylethanolamine, N-oleoylethanolamine, N-palmitoylethanolamine and 2-arachidonoylglycerol in human cells. *Anal Bioanal Chem.* févr 2015;407(6):1781-7.
135. Kantae V, Ogino S, Noga M, Harms AC, van Dongen RM, Onderwater GLJ, et al. Quantitative profiling of endocannabinoids and related N-acylethanolamines in human CSF using nano LC-MS/MS. *J Lipid Res.* mars 2017;58(3):615-24.
136. Gouveia-Figueira S, Nording ML. Validation of a tandem mass spectrometry method using combined extraction of 37 oxylipins and 14 endocannabinoid-related compounds including prostamides from biological matrices. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* sept 2015;121(Pt A):110-21.
137. Gouveia-Figueira S, Goldin K, Hashemian SA, Lindberg A, Persson M, Nording ML, et al. Plasma levels of the endocannabinoid anandamide, related N-acylethanolamines and linoleic acid-derived oxylipins in patients with migraine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* mai 2017;120:15-24.
138. Mutemberezi V, Masquelier J, Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Development and validation of an HPLC-MS method for the simultaneous quantification of key oxysterols, endocannabinoids, and ceramides: variations in metabolic syndrome. *Anal Bioanal Chem.* janv 2016;408(3):733-45.

139. Xiong X, Zhang L, Cheng L, Mao W. High-throughput salting-out assisted liquid-liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr BMC*. sept 2015;29(9):1317-24.
140. Garst C, Fulmer M, Thewke D, Brown S. Optimized extraction of 2-arachidonyl glycerol and anandamide from aortic tissue and plasma for quantification by LC-MS/MS. *Eur J Lipid Sci Technol EJLST*. mai 2016;118(5):814-20.
141. Kirkwood JS, Broeckling CD, Donahue S, Prenni JE. A novel microflow LC-MS method for the quantitation of endocannabinoids in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 15 oct 2016;1033-1034:271-7.
142. Mwanza C, Chen Z, Zhang Q, Chen S, Wang W, Deng H. Simultaneous HPLC-APCI-MS/MS quantification of endogenous cannabinoids and glucocorticoids in hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 15 août 2016;1028:1-10.
143. Marchioni C, de Souza ID, Grecco CF, Crippa JA, Tumas V, Queiroz MEC. A column switching ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in plasma samples. *Anal Bioanal Chem*. mai 2017;409(14):3587-96.
144. Ding J, Luo X-T, Yao Y-R, Xiao H-M, Guo M-Q. Investigation of changes in endocannabinoids and N-acylethanolamides in biofluids, and their correlations with female infertility. *J Chromatogr A*. 4 août 2017;1509:16-25.
145. Luque-Córdoba D, Calderón-Santiago M, Luque de Castro MD, Priego-Capote F. Study of sample preparation for determination of endocannabinoids and analogous compounds in human serum by LC-MS/MS in MRM mode. *Talanta*. 1 août 2018;185:602-10.
146. Röhrig W, Achenbach S, Deutsch B, Pischetsrieder M. Quantification of 24 circulating endocannabinoids, endocannabinoid-related compounds, and their phospholipid precursors in human plasma by UHPLC-MS/MS. *J Lipid Res*. août 2019;60(8):1475-88.
147. Gaitán AV, Wood JT, Zhang F, Makriyannis A, Lammi-Keefe CJ. Endocannabinoid Metabolome Characterization of Transitional and Mature Human Milk. *Nutrients*. 12 sept 2018;10(9).
148. Gurke R, Thomas D, Schreiber Y, Schäfer SMG, Fleck SC, Geisslinger G, et al. Determination of endocannabinoids and endocannabinoid-like substances in human K3EDTA plasma - LC-MS/MS method validation and pre-analytical characteristics. *Talanta*. 1 nov 2019;204:386-94.
149. Ney LJ, Felmingham KL, Bruno R, Matthews A, Nichols DS. Simultaneous quantification of endocannabinoids, oleoylethanolamide and steroid hormones in human plasma and saliva. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 sept 2020;1152:122252.
150. Gao W, Walther A, Wekenborg M, Penz M, Kirschbaum C. Determination of endocannabinoids and N-acylethanolamines in human hair with LC-MS/MS and their relation to symptoms of depression, burnout, and anxiety. *Talanta*. 1 sept 2020;217:121006.

151. Chu L, Li N, Deng J, Wu Y, Yang H, Wang W, et al. LC-APCI+-MS/MS method for the analysis of ten hormones and two endocannabinoids in plasma and hair from the mice with different gut microbiota. *J Pharm Biomed Anal.* 5 juin 2020;185:113223.
152. Balvers MGJ, Verhoeckx KCM, Witkamp RF. Development and validation of a quantitative method for the determination of 12 endocannabinoids and related compounds in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15 mai 2009;877(14-15):1583-90.
153. ChemSpider | Search and share chemistry [Internet]. [cité 28 mai 2021]. Disponible sur: <http://www.chemspider.com/>
154. Angelini R, Argueta DA, Piomelli D, DiPatrizio NV. Identification of a Widespread Palmitoylethanolamide Contamination in Standard Laboratory Glassware. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017;2(1):123-32.
155. Pastor A, Farré M, Fitó M, Fernandez-Aranda F, de la Torre R. Analysis of ECs and related compounds in plasma: artifactual isomerization and ex vivo enzymatic generation of 2-MGs. *J Lipid Res.* mai 2014;55(5):966-77.
156. Rouzer CA, Ghebreselasie K, Marnett LJ. Chemical stability of 2-arachidonylglycerol under biological conditions. *Chem Phys Lipids.* oct 2002;119(1-2):69-82.
157. Gachet MS, Rhyn P, Bosch OG, Quednow BB, Gertsch J. A quantitative LC-MS/MS method for the measurement of arachidonic acid, prostanoids, endocannabinoids, N-acylethanolamines and steroids in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 22 janv 2015;976-977:6-18.
158. Röhrig W, Waibel R, Perlwitz C, Pischetsrieder M, Hoch T. Identification of the oleic acid ethanolamide (OEA) isomer cis-vaccenic acid ethanolamide (VEA) as a highly abundant 18:1 fatty acid ethanolamide in blood plasma from rats and humans. *Anal Bioanal Chem.* sept 2016;408(22):6141-51.
159. Porter AC, Sauer J-M, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* juin 2002;301(3):1020-4.
160. Söderström AC, Nybo M, Nielsen C, Vinholt PJ. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. *Clin Chem Lab Med.* 1 déc 2016;54(12):1913-20.
161. Pryor SR. Is platelet release of 2-arachidonoyl-glycerol a mediator of cognitive deficits? An endocannabinoid theory of schizophrenia and arousal. *Med Hypotheses.* déc 2000;55(6):494-501.
162. Jian W, Edom R, Weng N, Zannikos P, Zhang Z, Wang H. Validation and application of an LC-MS/MS method for quantitation of three fatty acid ethanolamides as biomarkers for fatty acid hydrolase inhibition in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15 juin 2010;878(20):1687-99.
163. Petrosino S, Di Marzo V. FAAH and MAGL inhibitors: therapeutic opportunities from regulating endocannabinoid levels. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. janv 2010;11(1):51-62.

164. Liput DJ, Tsakalozou E, Hammell DC, Paudel KS, Nixon K, Stinchcomb AL. Quantification of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide in rodent brain tissue using high performance liquid chromatography-electrospray mass spectroscopy. *J Pharm Anal.* août 2014;4(4):234-41.
165. Privalov PL. Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1990;25(4):281-305.
166. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [Internet]. CRC Press; 2006 [cité 21 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.taylorfrancis.com/https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781420014549/liquid-chromatography-mass-spectrometry-wilfried-niessen>
167. Xia Y-Q, Jemal M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* juill 2009;23(14):2125-38.
168. Tang YQ, Weng N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis.* juin 2013;5(12):1583-98.
169. Mazzola PG, Lopes AM, Hasmann FA, Jozala AF, Penna TC, Magalhaes PO, et al. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *J Chem Technol Biotechnol.* 2008;83(2):143-57.
170. Fernández-Suárez D, Celorrio M, Riezu-Boj JI, Ugarte A, Pacheco R, González H, et al. Monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 is neuroprotective and alters glial cell phenotype in the chronic MPTP mouse model. *Neurobiol Aging.* nov 2014;35(11):2603-16.
171. Celorrio M, Fernández-Suárez D, Rojo-Bustamante E, Echeverry-Alzate V, Ramírez MJ, Hillard CJ, et al. Fatty acid amide hydrolase inhibition for the symptomatic relief of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun.* oct 2016;57:94-105.
172. González-Aparicio R, Moratalla R. Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* févr 2014;62:416-25.
173. Esposito E, Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Cuzzocrea S. Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PloS One.* 2012;7(8):e41880.
174. Jung K-M, Astarita G, Yasar S, Vasilevko V, Cribbs DH, Head E, et al. An amyloid  $\beta$ 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* août 2012;33(8):1522-32.
175. Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, et al. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 3 déc 2003;23(35):11136-41.
176. Mulder J, Zilberter M, Pasquaré SJ, Alpár A, Schulte G, Ferreira SG, et al. Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Brain J Neurol.* avr 2011;134(Pt 4):1041-60.

177. Altamura C, Ventriglia M, Martini MG, Montesano D, Errante Y, Piscitelli F, et al. Elevation of Plasma 2-Arachidonoylglycerol Levels in Alzheimer's Disease Patients as a Potential Protective Mechanism against Neurodegenerative Decline. *J Alzheimers Dis JAD*. 2015;46(2):497-506.
178. Chen R, Zhang J, Wu Y, Wang D, Feng G, Tang Y-P, et al. Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Rep*. 29 nov 2012;2(5):1329-39.
179. D'Agostino G, Russo R, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. Palmitoylethanolamide protects against the amyloid- $\beta$ 25-35-induced learning and memory impairment in mice, an experimental model of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. juin 2012;37(7):1784-92.
180. Battista N, Bari M, Tarditi A, Mariotti C, Bachoud-Lévi A-C, Zuccato C, et al. Severe deficiency of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity segregates with the Huntington's disease mutation in peripheral lymphocytes. *Neurobiol Dis*. juill 2007;27(1):108-16.
181. Jean-Gilles L, Feng S, Tench CR, Chapman V, Kendall DA, Barrett DA, et al. Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 15 déc 2009;287(1-2):212-5.



Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2020/2021

**Nom : GISH**  
**Prénom : Alexandr**

**DEVELOPPEMENT, VALIDATION ET MISE EN ŒUVRE D'UNE METHODE DE  
DOSAGE PAR CL-SM/SM DES ENDOCANNABINOIDES PLASMATIQUES**

**Mots-clés :** le système endocannabinoïde, AEA, 2-AG, PEA, OEA, Dosage CL-SM/SM, Norme ISO 15 189.

**Résumé :** Dans le domaine médical, le système endocannabinoïde (SEC) est un sujet qui est d'actualité pour des raisons scientifiques et médiatiques (cannabis, cannabidiol, ...). Toutefois, la connaissance précise de ses rôles en situation physiologique ou pathologique demeure imparfaite. L'objectif de ce travail est (i) de présenter l'état d'art des méthodologies de dosage des endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like, et (ii) de développer et de valider une méthode de dosage de quatre molécules endocannabinoïdes (AEA, 2-AG, PEA, OEA) plasmatiques par CL-SM/SM. Une synthèse bibliographique des 10 dernières années a rendu possible le développement et la mise en place de la méthode de dosage multiparamétrique plasmatique qui a été validée dans un environnement d'accréditation selon la Norme ISO 15 189. L'intérêt croissant du monde scientifique sur le système endocannabinoïde justifie ce travail et la place de cette méthode comme un outil important dans les recherches fondamentales et cliniques (diagnostic et suivi) futures.

---

**Quantitative method for the determination of endocannabinoids in human plasma by LC-MS/MS : development, validation and implementation.**

**Keywords:** Endocannabinoid system, AEA, 2-AG, PEA, OEA, LC-MS/MS, ISO 15 189 norm.

**Abstract:** In the medical field, the endocannabinoid system constitutes a topical subject for several scientific and media reasons (cannabis, cannabidiol, etc). However, accurate data about its roles in physiological and pathological processes remain imperfect. The objective of this work is (i) to present the state of knowledge of endocannabinoid and endocannabinoid-like assays, and (ii) to perform the development and validation of a method for AEA, 2-AG, PEA, OEA determinations in plasma using a LC-MS/MS method. A bibliographical summary of the last 10 years enable to the establishment of the assay method that has been successfully validated according to ISO 15 189 norm. The great deal of interest from scientific world in the endocannabinoid system supports the place of this work as an important future tool in fundamental and clinical trials.

---

**Membres du jury :**

**Président : ALLORGE Delphine, PU-PH, PharmD, PhD, HDR**

**Membre(s) extérieur(s) :**

**Directeur de thèse : GAULIER Jean-Michel, PH, PharmD, PhD, HDR**  
**DEVOS David, PU-PH, MD, PhD, HDR**  
**ROLLAND Benjamin, PU-PH, MD, PhD, HDR**