



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER IN BIOLOGY

Etude des effets des lipoprotéines de faible densité (LDL) modifiées sur des macrophages murins en culture par l'approche protéomique

CALAY, Damien

Award date:
2005

Awarding institution:
University of Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ETUDE DES EFFETS DES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE (LDL) MODIFIEES SUR DES
MACROPHAGES MURINS EN CULTURE PAR L'APPROCHE PROTEOMIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Damien CALAY

Juin 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude des effets des lipoprotéines de faible densité (LDL) modifiées sur des macrophages murins en culture par l'approche protéomique

CALAY Damien

Résumé

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) jouent un rôle considérable dans le développement de l'athérosclérose. En effet, une fois infiltrées puis oxydées dans la paroi artérielle, les LDL sont internalisées par les macrophages via les récepteurs 'scavengers' et conduisent à la formation de cellules spumeuses, principal type cellulaire composant la plaque d'athérome. Bien que l'acétylation des LDL n'ait pas lieu *in vivo*, les LDL acétylées constituent un système expérimental de référence, pour étudier les surcharges lipidiques, sans stress oxydatif.

Ce mémoire vise donc à étudier les effets des LDL oxydées et acétylées sur des macrophages murins en culture, et ce, dans le but de mieux comprendre l'importance relative de la lipotoxicité et des stress oxydatifs liés aux LDL oxydées, dans le mécanisme de développement des lésions athéromateuses. Pour ce faire, ce travail a été divisé en deux parties. Dans un premier temps, nous avons validé les conditions de stimulation du modèle cellulaire étudié dans ce travail, en vérifiant que les macrophages murins utilisés répondaient bien aux LDL oxydées ou acétylées, sans qu'il n'y ait de toxicité excessive. Les LDL oxydées induisent bien l'expression du gène *Gclm*, comme décrit dans la littérature.

Dans une seconde étape, nous avons voulu mettre en évidence des variations d'expression au niveau protéique entre des macrophages murins stimulés ou non avec des LDL oxydées. Pour cela, nous avons utilisé la technique des gels 2D via la méthode DIGE. Nous sommes parvenus à identifier, par spectrométrie de masse, plusieurs protéines dont l'expression varie après stimulation des macrophages avec des LDL oxydées. Enfin, un Western Blot a permis de confirmer la surexpression de l'une d'entre elles, la *Gclm*.

Ce travail constitue donc la première étape d'un travail comparatif plus large visant à comparer les effets des LDL oxydées et des LDL acétylées sur l'expression génique des macrophages.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

Promoteur Prof. M. Raes

Remerciements

Au terme de ces quelques mois passés au labo URBC, je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je voudrais d'abord remercier Monsieur le Professeur Remacle de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie également Madame le Professeur Martine Raes pour la lecture et la correction de ce mémoire, pour ses conseils judicieux et ses remarques pertinentes, ainsi que pour sa bonne humeur et son dynamisme quotidien.

Un tout grand merci à Sofia pour m'avoir accompagné tout au long de ce mémoire, pour sa disponibilité, ses conseils, et pour le temps consacré à la lecture et la correction de ce travail.

Je voudrais également remercier Edouard qui m'a permis de réaliser des gels 2D, pour ses explications, son calme, et sa patience.

Merci aussi à Marc pour le temps consacré aux analyses en spectrométrie de masse, ainsi que pour sa disponibilité à régler les problèmes informatiques.

Je n'oublie pas non plus les autres mémorants avec lesquels j'ai passé d'agréables moments. Un merci tout particulier à Julien pour sa présence, sa disponibilité, et sa bonne humeur au quotidien.

Merci également à mon frère pour son aide à la mise en page de ce mémoire et pour ses encouragements.

Enfin, je remercie mes parents de m'avoir permis de réaliser ces études et de m'avoir soutenu durant ces 4 années.

Liste des abréviations

2D – DIGE	Two Dimension Difference In-Gel Electrophoresis
ABCA1	ATP-Binding Cassette sous famille A membre 1
ACAT	Acyl-coenzyme A Cholesterol Acyl Transferase
AcLDL	LDL acétylées
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AKR	Aldo-Kéto Réductase
AKR 1	AKR famille 1
Ang II	Angiotensine II
AP-1	Activated Protein-1
Apo	Apolipoprotéine
ApoER2	Apolipoprotein E Receptor-2
APS	Ammonium PerSulfate
ARE	Antioxidant Response Element
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
Arts-1	aminopeptidase regulator of TNF-R1 shedding
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphénol
BSA	Bovine Serum Albumin
CETP	Cholesterol Ester Transfer Protein
CHR	Centre Hospitalier Régional
CML	Cellule Musculaire Lisse
CSPG	ProtéoGlycans à Chondroïtines Sulfates
CTL	Contrôle
Cy	Cyanine
DBP	Vitamine D Binding Protein
DMEM –HG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose
DO	Densité Optique
DTT	DiThioThréitol
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Epidermal Growth Factor Precursor
eIF3	Eukaryotic translation Initiation Factor 3
EpRE	Electrophile Response Element
ESI	ElectroSpray Ionisation
ET	Endothéline
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fpps	Farnesyl diphosphate synthétase
G6pd	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAG	GlycosAminoGlycanes
Gapdh	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Gcl	Glutamate cystéine ligase
<i>Gclc</i>	Gène codant la Gcl
Gcl	Sous-unité catalytique de la Gcl

<i>Gclm</i>	Gène codant la Gclm
Gclm	Sous-unité régulatrice de la Gcl
GM-CSF	Granulocyte / Macrophage-Colony Stimulating Factor
GSH	Glutathion, forme réduite
GSSG	Glutathion, forme oxydée
h	heure
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Lipase Hépatique
HMG-CoA réductase	Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-coenzyme A réductase
HODE	HydroxyOctaDecadiEnoic acid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSPG	ProtéoGlycans à Héparanes Sulfates
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule 1
ICAT	Isotope Coded Affinity Tag
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IEF	IsoElectric Focusing
IL-12	InterLeukine-12
IPG	Immobilized pH gradient
IRES	Internal Ribosomal Entry Sites
kDa	kiloDalton
□	Longueur d'onde
Lasp-1	LIM and SH3 Protein – 1
LC	Liquid chromatography
LCAT	Lecithine Cholesterol Acyl Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	Récepteur aux LDL
LOX-1	Lectin-like Oxidized LDL receptor-1
Lp(a)	Lipoprotéine (a)
LPC	LysoPhosphatidylCholine
LPL	LipoProtein Lipase
LRP	LDL Receptor Related Protein
µg	microgramme
µl	microlitre
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
mCbp	poly(rC) binding protein 2
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDA	Malondialdéhyde
ml	millilitre
mM	millimolaire
MM-LDL	Mildly Modified LDL
mm-LDL	Minimally Modified LDL
MMP	Matrix Metalloproteinase
MS	Spectromètre de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology

NAD(P)H	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate), forme réduite
NatLDL	LDL natives
ng	nanogramme
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
NO [•]	Oxyde nitrique
Nrf-2	NF-E2 related factor 2
O ₂ ^{•-}	Anion superoxide
OxLDL	LDL oxydées
P/C/I	Phénol/Chloroforme/Isoamyl alcohol
PAF	Platelet Activating Factor
PAP	3'-PhosphoAdénosine 5'-Phosphate
pb	Paires de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymérase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PGI ₂	Prostacycline
pI	Point Isoélectrique
PI3K	PhosphatidyInositol 3 kinase
PKC	Protéine Kinase C
PM	Poids moléculaire
Pp1	Protéine phosphatase 1
PPAR□	Peroxisome Proliferator Activated Receptor □
Prx	Peroxiredoxine
PUFA	PolyUnsaturated Fatty Acid
Q-TOF	Spectromètre de masse de type Quadrupole - time of flight
RBP	Retinol Binding Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
RpA	Replication Protein A
rpm	tours par minute
RXR	Récepteur à l'acide rétinoïque
SCX	Strong Cation Exchange
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS – PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SILAC	Stable-Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture
SR-A	Récepteur Scavenger de classe A
SR-B I	Scavenger Receptor class B member 1
TBA	Acide Thio-Barbiturique
T-BARS	Thio-Barbituric Acid Reactive Substance
<i>Tbp</i>	Gène codant la Tata box Binding Protein
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS-Tween
TCA	Acide TriChloroAcétique
TEMED	N,N,N',N' - TEtraMethylEthylène Diamine
TF	Facteur Tissulaire
TGF	Transforming Growth Factor
Tim 50	Translocase of the Inner Mitochondrial membrane 50
Tm	Température de melting
TMP	1,1,3,3-tétraméthoxypropane

TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R1	Récepteur du TNF de type 1
TOF	Time Of Flight
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDL-R	Récepteur aux VLDL

TABLE DES MATIERES

<u>I. INTRODUCTION</u>	1
<u>1. L'ATHEROSCLEROSE</u>	1
<u>1.1. Structure d'une artère</u>	1
<u>1.2. Principaux types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose</u>	2
1.2.1. Les cellules endothéliales	2
1.2.2. Les monocytes / macrophages	3
1.2.3. Les cellules musculaires lisses	3
<u>1.3. Les lésions de l'athérosclérose</u>	3
<u>1.4. Théories explicatives de l'athérosclérose</u>	4
1.4.1. L'hypothèse de réponse à l'agression	4
1.4.2. L'hypothèse de la rétention lipidique	4
1.4.3. L'hypothèse de modification oxydative	5
1.4.4. En résumé	5
<u>2. LES LIPOPROTEINES</u>	5
<u>2.1. Les différentes classes de lipoprotéines</u>	6
<u>2.2. Transport des lipides et métabolisme des lipoprotéines</u>	6
2.2.1. La voie exogène	6
2.2.2. La voie endogène	7
2.2.3. Le transport inverse	7
<u>2.3. Les LDL et leurs modifications</u>	8
2.3.1. Les LDL	8
2.3.2. Le récepteur aux LDL	8
2.3.3. Modifications des LDL	9
2.3.3.1. <i>Oxydation</i>	9
1. Rétention des LDL	9
2. Mécanismes d'oxydation des LDL	10
3. Les différentes LDL oxydées	11
2.3.3.2. <i>Acétylation</i>	12
2.3.3.3. <i>Récepteurs aux LDL modifiées</i>	12
1. Les récepteurs 'scavengers' de classe A : SR-A I et SR-A II	13
2. Les récepteurs 'scavengers' de classe B	13
2.1. CD 36	13
2.2. SR-B I	14
3. LOX-1	14
<u>2.4. Effets des LDL oxydées sur les macrophages</u>	14
2.4.1. D'un point de vue phénotypique	14
2.4.2. D'un point de vue moléculaire	15
<u>3. L'APPROCHE PROTEOMIQUE</u>	16
<u>3.1. Protéomique et transcriptomique</u>	16
3.1.1. La transcriptomique	16
3.1.2. La protéomique	16
<u>3.2. La protéomique</u>	17
3.2.1. Les approches protéomiques gel-dépendantes	17

3.2.1.1. <i>Gels 2D conventionnels</i>	17
3.2.1.2. <i>Le 2D-DIGE</i>	18
3.2.1.3. <i>L'identification des protéines par spectrométrie de masse</i>	19
3.2.2. Les approches protéomiques gel-indépendantes	20
3.2.2.1. <i>La MudPIT</i>	20
3.2.2.2. <i>Le marquage aux isotopes stables</i>	20
<u>4. OBJECTIFS DU MEMOIRE</u>	22
<u>II. MATERIELS ET METHODES</u>	23
<u>1. CULTURE CELLULAIRE</u>	23
<u>2. ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES</u>	23
<u>3. DOSAGE ET OXYDATION DES LDL</u>	24
<u>3.1. Dosage des LDL</u>	24
<u>3.2. Oxydation des LDL</u>	24
<u>3.3. Mesure de l'oxydation des LDL</u>	25
<u>4. CYTOTOXICITE DUE AUX LDL</u>	26
<u>5. ANALYSE DE L'EXPRESSION GENIQUE</u>	26
<u>5.1. Extraction d'ARN total</u>	26
<u>5.2. Transcription inverse</u>	27
<u>5.3. PCR en temps réel</u>	27
<u>6. PROTEOMIQUE</u>	28
<u>6.1. Préparation des échantillons</u>	29
<u>6.2. Electrophorèse en IEF</u>	30
<u>6.3. Electrophorèse SDS-PAGE</u>	30
<u>6.4. Révélation</u>	31
6.4.1. Coloration à l'argent	31
6.4.2. Révélation et analyse en 2D-DIGE	31
6.4.3. Marquage au ruthénium	32
<u>7. WESTERN BLOT</u>	32
<u>III. RESULTATS ET DISCUSSION</u>	35
<u>1. VALIDATION DES CONDITIONS DE STIMULATION DES MACROPHAGES RAW 264.7</u>	35
<u>1.1. Modèle cellulaire</u>	35
<u>1.2. Isolement, oxydation et dosage des LDL</u>	35
<u>1.3. Mesure de l'oxydation des LDL</u>	36
<u>1.4. Etude de la cytotoxicité des LDL natives et modifiées sur les macrophages</u>	36
<u>1.5. Etude de l'induction de gènes par les LDL oxydées par la PCR en temps réel</u>	37
1.5.1. Effet du temps d'incubation et des concentrations en LDL oxydées – Expériences préliminaires	38

1.5.2. Effet dose dépendant de la stimulation des macrophages avec des LDL oxydées	38
1.5.3. Cinétique de stimulation des macrophages avec des LDL oxydées	39
1.5.4. Stimulation des macrophages avec des LDL natives ou modifiées	39
1.5.5. Discussion	39
<u>2. ETUDE DES VARIATIONS D'EXPRESSION GENIQUE DE MACROPHAGES STIMULES OU NON AVEC LDL OXYDEES PAR UNE APPROCHE PROTEOMIQUE</u>	41
<u>2.1. Expériences préliminaires – Gels bidimensionnels colorés à l'argent</u>	41
<u>2.2. Effets des LDL oxydées – Approche protéomique en gels 2D-DIGE</u>	42
2.2.1. Macrophages RAW 264.7 stimulés pendant 6 heures	42
2.2.2. Macrophages RAW 264.7 stimulés pendant 24 heures	44
2.2.2.1. Gels, analytiques	44
2.2.2.2. Gel préparatif	45
<u>3. ETUDE DE LA SUREXPRESSION DE GCLM APRES STIMULATION DES MACROPHAGES AVEC DES LDL OXYDEES PAR WESTERN BLOT</u>	52
<u>IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	54
<u>V. BIBLIOGRAPHIE</u>	57

I. INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Ce mémoire consiste à étudier les effets des lipoprotéines de faible densité (LDL) modifiées, soit par oxydation, soit par acétylation, sur des macrophages murins en culture en utilisant une approche protéomique. Ce travail s'inscrit dans le cadre des travaux de l'URBC dans le contexte de l'athérosclérose, pathologie causant des maladies cardiovasculaires, premières causes de décès dans l'Europe de l'Ouest, mais aussi au niveau mondial (Pepine, 2001). Etant donné les implications de santé publique de cette maladie, il n'est pas surprenant que des efforts considérables aient été fournis afin de comprendre les mécanismes moléculaires de l'athérosclérose et de mieux cerner les facteurs de risques associés.

L'introduction de ce mémoire va s'organiser en trois parties principales. La première partie va consister à introduire l'athérosclérose, ses différentes lésions et les types cellulaires impliqués dans celle-ci. La seconde partie va introduire les lipoprotéines, en s'attardant plus longuement sur les LDL modifiées et leurs interactions avec les macrophages. Enfin, l'approche protéomique choisie afin d'étudier les effets des LDL modifiées sur les macrophages, sera présentée dans la dernière partie.

1. L'ATHEROSCLEROSE

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire et dégénérative, caractérisée par un épaississement de la paroi des grosses et moyennes artères (aorte abdominale, coronaires, artères cérébrales, artères fémorales), dû à une accumulation de graisses et à un remaniement des couches composant la paroi artérielle (Ross, 1999). Cette accumulation de lipides, formant des plaques jaunâtres appelées athéromes, n'est pas uniforme et touchera de préférence les bifurcations (Richter *et al.*, 2004). Une rupture de la plaque entraîne la formation d'un thrombus dont le but premier est de colmater la blessure, mais qui est susceptible d'obstruer par le fait même la lumière de l'artère et de provoquer entre autres un infarctus (cardiopathie ischémique) ou un accident vasculaire cérébral (Davies *et al.*, 2004 ; Rudd *et al.*, 2005).

L'athérosclérose, à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires est la première cause de mortalité au niveau mondial. D'après les prévisions, elle devrait garder ce statut au moins jusqu'en 2020 (Pepine, 2001) (Tableau I.1). Signalons quand même que la mortalité due aux maladies cardiovasculaires, bien qu'étant à la première place des causes de décès au niveau mondial, varie parfois de façon importante d'un pays à l'autre (Takei *et al.*, 2005) (Figure I.1).

L'athérosclérose peut se développer dès la naissance et survient lentement, sur une période couvrant plusieurs décennies. Un certain nombre d'éléments sont susceptibles de favoriser l'apparition ou l'aggravation de l'athérosclérose. Citons par exemple l'excès de mauvais cholestérol, le tabagisme, l'hypertension, le diabète mais aussi l'âge, le sexe, les antécédents familiaux, l'obésité et la sédentarité (Sacco *et al.*, 1999).

1.1. Structure d'une artère

Les artères se classent en 3 catégories :

1. Les artères élastiques de grand calibre telles que l'aorte ;
2. Les artères musculaires de moyen calibre comme les artères coronaires ;
3. Les petites artères qui cheminent à l'intérieur des tissus, organes et parenchymes.

La paroi artérielle est constituée de 3 couches (Figure I.2.). En partant de la lumière artérielle, on trouve :

1. *L'intima* : Directement adjacente à la lumière artérielle, elle est composée d'une unique couche continue de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale et d'une fine couche conjonctive, la subendothéliale. Elle est bordée par une couche d'élastine, la limitante élastique interne, formant la jonction entre l'intima et la média.

2. *La média* : Elle est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses empilées de façon concentrique en couches appelées unités lamellaires dont le nombre varie suivant le type d'artère. Une lame d'élastine, la limitante élastique externe, sépare la media de l'adventice.

3. *L'adventice* : Couche la plus externe de l'artère, elle est typiquement composée d'une matrice lâche d'élastine, de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de collagène. Les *vasa vasorum* assurent l'irrigation de cette couche mais aussi de la partie externe de la média. L'adventice comprend aussi un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés qui rejoint les fibres musculaires lisses de la média.

1.2. Principaux types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose

De nombreux types de cellules sont impliqués dans le processus de développement de l'athérosclérose : les cellules endothéliales, les monocytes, les cellules musculaires lisses agissent de concert contribuant à augmenter la taille des lésions. De manière plus hypothétique, les lymphocytes T et les plaquettes pourraient jouer un rôle respectivement dans l'initiation et l'aggravation des lésions (Ross, 1995 ; Ross, 1993).

1.2.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont des cellules pavimenteuses formant une barrière semi-perméable entre le compartiment sanguin et le tissu. Elles possèdent de nombreuses fonctions, qui, quand elles sont altérées, peuvent participer à l'athérogenèse. Parmi ces fonctions, citons le fait que les cellules endothéliales constituent une surface non-adhérente pour les leucocytes et les plaquettes, et une barrière qui contrôle les échanges de nutriments et de fluide entre le plasma et la paroi artérielle. L'endothélium permet aussi de maintenir un tonus vasculaire par la libération d'agents vasoactifs, par exemple, l'oxyde nitrique (NO[·]), la prostacycline (PGI₂), les endothélines (ET) ou l'angiotensine II (Ang II). Ces fonctions incluent également la formation et la sécrétion de facteurs de croissance, d'agents anti-thrombogéniques, de molécules pro et anti-coagulantes, et de cytokines, ainsi que la formation de tissu conjonctif. Enfin, les cellules endothéliales possèdent la capacité de modifier des substances du plasma, telles que les lipoprotéines, lors de leur transport dans la paroi artérielle (Badimon et Martinez-Gonzalez, 2002).

Aux endroits de turbulences tels les points de bifurcations, une blessure endothéliale peut causer l'altération de l'une ou l'autre de ces fonctions et par conséquent, l'activation des cellules endothéliales. Celles-ci vont alors exprimer des molécules d'adhérence pour les leucocytes (ICAM-1, VCAM-1) et les plaquettes (PECAM) (Ross, 1995). De plus, l'activation de l'endothélium augmente considérablement sa perméabilité, et dans le cas d'un excès de cholestérol, les LDL circulantes dans le sang s'engouffrent sous l'endothélium. A cet endroit, les antioxydants étant moins nombreux que dans le compartiment sanguin, il va se produire une oxydation des LDL.

1.2.2. Les monocytes / macrophages

Les cellules endothéliales activées produisent des médiateurs, tels que le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) (Schratzberger *et al.*, 1998) et surexpriment des molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1, ...) (Ross, 1995), permettant le recrutement et la diapédèse de monocytes. Dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages. Ceux-ci sont des sources importantes de facteurs de croissance et de cytokines, principaux médiateurs de la migration et de la prolifération cellulaire dans les lésions de l'athérosclérose (Ross, 1993). Les macrophages constituent également la principale source de cellules spumeuses, via l'internalisation de LDL oxydées par les récepteurs 'scavengers'. Les LDL oxydées vont induire la sécrétion, par les macrophages, de molécules induisant la prolifération des monocytes (M-CSF, GM-CSF, ...), des cellules musculaires lisses (PDGF, TGF β , ...), et des cellules endothéliales (VEGF, FGF, TGF α , ...). Les macrophages activés sécrètent aussi des agents chimiotactiques pour les monocytes (M-CSF, GM-CSF, MCP-1, oxLDL, ...), pour les cellules musculaires lisses (TGF β , PDGF, FGF, ...), et pour les cellules endothéliales (VEGF, bFGF) (Ross, 1995).

1.2.3. Les cellules musculaires lisses (CML)

Comme expliqué ci-dessus, plusieurs agents induisent la migration des CML de la média vers l'intima, ainsi que leur prolifération dans cette région. Les CML peuvent, comme les macrophages, internaliser des LDL oxydées et former des cellules spumeuses. Elles sont également une source de facteurs de croissance et de cytokines (Ross, 1995). Par conséquent, elles contribuent à l'épaississement de l'intima et au développement de la lésion. Dans l'intima, les cellules musculaires lisses vont passer d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique (Mori et Saito, 1996) et vont produire du collagène, formant la chape fibreuse de l'athérome.

1.3. Les lésions de l'athérosclérose

Les lésions athérosclérotiques ou athéromes évoluent selon 3 stades : la strie lipidique, la lésion fibro-graisseuse et la plaque athéromateuse, plus ou moins complexe (Ross, 1995 ; Tedgui et Mallat, 1999).

La **strie lipidique** est caractérisée par une accumulation intimale de macrophages gorgés de lipides - les cellules spumeuses - et de lymphocytes T. Cette accumulation provoque un léger soulèvement de l'intima et donne à la lésion une couleur jaunâtre.

Cette lésion, qui peut apparaître dès l'enfance, est réversible mais peut évoluer vers la plaque d'athérome. La pénétration de LDL dans l'intima conduit à leur oxydation, ce qui va induire l'activation de l'endothélium. Celui-ci va notamment exprimer des molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1) pour les monocytes et lymphocytes T circulant dans le sang. Dans l'intima, les monocytes vont se différencier en macrophages, qui vont internaliser les LDL oxydées et former des cellules spumeuses (Ross, 1995).

La strie lipidique s'épaissit progressivement en **lésion fibro-graisseuse**. Les cytokines sécrétées par les macrophages stimulent la prolifération des cellules de l'intima et provoquent la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima, où elles vont se diviser (Shen *et al.*, 2001) et synthétiser du collagène. Ces cellules musculaires lisses peuvent également internaliser des LDL oxydées et former des cellules spumeuses (Ross, 1995). La

cytotoxicité des LDL oxydées mène à la nécrose d'une partie des cellules spumeuses et à la formation d'un cœur nécrotique. La lésion fibro-graisseuse est donc caractérisée par une matrice fibreuse résistante et par un cœur nécrotique, composé de cellules spumeuses, de débris cellulaires et de cristaux de cholestérol.

La **plaque d'athérome** est caractérisée par un cœur nécrotique coiffé d'une chappe fibreuse. La croissance du cœur nécrotique entraîne progressivement une réduction du calibre de la lumière artérielle (Figure I.3.). De plus, les cellules spumeuses sécrètent de nombreux médiateurs, dont les MMP (Matrix Metalloproteinases) (Chase et Newby, 2003 ; Luan *et al.*, 2003) qui en dégradant le collagène, rendent la matrice fibreuse plus fragile. Les cellules spumeuses produisent aussi du facteur tissulaire (TF) intervenant dans les réactions de coagulation et la formation de caillots. Lors de la rupture de la plaque fragilisée, le TF interagit avec les facteurs de coagulation sanguine et provoque la formation d'un caillot (Petit *et al.*, 1999). Si la taille de celui-ci est assez importante, il peut mener à l'obstruction de l'artère.

Bien que la rupture de la plaque d'athérome soit la principale cause de thrombose, d'autres complications peuvent survenir, menant aux mêmes conséquences cliniques. L'ulcération correspond à l'érosion du tissu endothélial au niveau de la plaque et entraîne l'adhérence plaquettaire et l'initiation d'un thrombus pariétal (Capron et Bruneval, 1989). La plaque athéromateuse possédant une vascularisation propre, une hémorragie au cœur de la plaque est possible dans le cœur lipidique (Kolodgie *et al.*, 2003). Celle-ci va entraîner une augmentation brutale du volume de la plaque, qui peut être accompagnée de l'occlusion de l'artère. La lésion peut également se calcifier.

1.4. Théories explicatives de l'athérosclérose

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer les événements initiateurs et les éléments intervenant dans le développement des lésions de l'athérosclérose.

1.4.1. L'hypothèse de réponse à l'agression

Les premières hypothèses explicatives de l'athérosclérose sont 'l'hypothèse d'incrustation' de Rokitsansky, suggérant que l'épaississement de l'intima est dû à un dépôt de fibrine artériel, et 'l'hypothèse de transsudation lipidique' de Virchow, selon laquelle des complexes lipidiques associés à des mucopolysaccharides causent l'athérosclérose. Un point commun entre ces deux hypothèses est le caractère passif des dépôts, les cellules sanguines et/ou vasculaires ne jouant aucun rôle actif. Ross *et al.* (1977) ont radicalement changé cette pensée en proposant 'l'hypothèse de réponse à l'agression'. Dans cette hypothèse, l'étape initiale de l'athérogenèse est une 'desquamation' endothéliale menant à diverses réponses compensatoires qui altèrent les propriétés homéostatiques vasculaires normales. Cette blessure endothéliale va causer l'apparition d'une strie lipidique (Figure I.4.).

L'hypothèse initiale de 'desquamation' de l'endothélium a récemment été revue. Il apparaît clairement aujourd'hui qu'un dysfonctionnement endothélial est suffisant pour initier l'athérosclérose à travers une perméabilité endothéliale accrue pour les lipoprotéines athérogènes.

1.4.2. L'hypothèse de la rétention lipidique

Cette hypothèse suggère que la rétention des lipoprotéines est l'évènement initiateur de l'athérosclérose (Figure I.5.) (Stocker et Keaney, 2004). Les mécanismes impliqués dans cette

réétention commencent seulement à être élucidés. 85 % des lipoprotéines sous-endothéliales seraient le résultat d'une transcytose et ce processus serait restreint à des particules dont le diamètre est inférieur à 70 nm. Cette restriction de taille est importante car elle suggère que la lipoprotéine lipase, enzyme digérant les triglycérides des lipoprotéines, est nécessaire pour que les lipoprotéines atteignent la sous-endothéliale (Simionescu et Simionescu, 1993). De plus, il a été montré que l'apolipoprotéine B 100 (apo B 100), associée aux LDL, est retenue dans la paroi artérielle en association étroite avec des protéoglycans (Camejo *et al.*, 1991). Ces données supportent l'hypothèse d'un rôle important de la liaison aux protéoglycans pour la rétention des lipoprotéines contenant de l'apolipoprotéine B dans les étapes précoces de l'athérosclérose. Une fois retenues dans la paroi artérielle, les LDL peuvent former des micro-agrégats. Ceux-ci sont rapidement capturés par les macrophages et les cellules musculaires lisses, menant à la formation de cellules spumeuses (Ismail *et al.*, 1994).

1.4.3. L'hypothèse de modification oxydative

Cette hypothèse se focalise sur le concept que les LDL dans leur état natif ne sont pas athérogènes, alors que les LDL modifiées chimiquement sont internalisées par les macrophages à travers la voie des récepteurs 'scavengers' (Goldstein *et al.*, 1979). D'après cette hypothèse, les LDL traversent l'espace sub-endothélial à des sites artériels sujets aux lésions. Lors de ce processus, les lipides des LDL subissent une oxydation progressive (Figure I.6.). On sait maintenant que cette oxydation des lipides des LDL et la modification de l'apolipoprotéine B 100 résultante (Chisolm et Steinberg, 2000) donnent aux LDL la capacité de se lier aux récepteurs 'scavengers'.

On a ensuite émis l'hypothèse selon laquelle les LDL modifiées pouvaient être bioactives. Il a été montré, par exemple, que les LDL oxydées sont chémoattractives pour les monocytes (Quinn *et al.*, 1987) et les lymphocytes T (McMurray *et al.*, 1993). De plus, elles stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses (Chatterjee, 1992).

1.4.4. En résumé

Les hypothèses décrites ci-dessus ont chacune tenté d'expliquer les événements cellulaires complexes de l'athérosclérose. L'hypothèse de réponse à l'agression se focalise sur une blessure vasculaire comme événement initiateur de l'athérosclérose. Par contre, l'hypothèse de rétention lipidique mentionne des interactions lipoprotéines - matrice extracellulaire comme événement critique de l'athérosclérose précoce. L'hypothèse de modification lipidique, quant à elle, requiert l'oxydation des LDL.

Bien que chaque hypothèse mette en avant un événement initiateur différent, plusieurs caractéristiques communes se retrouvent dans ces hypothèses. Par exemple, toutes prévoient une composante inflammatoire, une caractéristique bien connue de l'athérosclérose. Chaque hypothèse inclut aussi les LDL comme des éléments centraux, un point important vu que la réduction du taux de LDL - cholestérol est parmi les moyens les plus efficaces de traiter l'athérosclérose.

2. LES LIPOPROTEINES

Il est depuis longtemps démontré que les lipoprotéines ont un rôle central dans le développement de l'athérosclérose. Une relation causale entre la concentration en lipoprotéines plasmatiques et la susceptibilité de développer des lésions athérosclérotiques est connue depuis de nombreuses années. Les LDL et les VLDL ont un effet pro-athérogène, alors que les HDL sont anti-athérogènes (Barter, 2005).

2.1. Les différentes classes de lipoprotéines

Les lipoprotéines forment un ensemble de macromolécules de taille et de composition variables (Tableau I.2). Elles sont constituées de protéines (les apolipoprotéines) et de lipides (cholestérol, phospholipides et triglycérides). Elles ont été initialement isolées en fonction de leur densité : VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein) ou de leur mobilité électrophorétique (α , pré β et β).

Désormais, les lipoprotéines forment 4 groupes principaux d'importance variable. Les triglycérides sont transportés principalement par les **chylomicrons** et les **VLDL**. Le cholestérol et les phospholipides sont prépondérants dans les **LDL** et les **HDL**.

Ces 4 classes de lipoprotéines ont une structure générale comparable : elles sont formées d'un corps lipidique hydrophobe - contenant essentiellement des triglycérides et des esters de cholestérol - enrobé d'une monocouche de lipides polaires constituée de phospholipides et de cholestérol libre. Des protéines spécifiques, nommées apolipoprotéines (apo), à la surface des lipoprotéines assurent leur stabilité et en contrôlent le devenir métabolique (Ginsberg, 1998). Leurs propriétés sont résumées dans le tableau I.2. et la structure d'une particule de LDL est illustrée à la figure I.7.

Des techniques d'analyse plus fines permettent de définir des **sous-classes de ces principales lipoprotéines**. Il existe ainsi deux principales classes de VLDL : les VLDL1 ou VLDL larges, riches en triglycérides, et les VLDL2 ou petites VLDL. Les LDL ont été également séparées en 2 ou 5 classes en fonction de leur taille. Les LDL petites et denses sont présentes à des concentrations élevées chez des patients à haut risque d'athérosclérose (Chapman *et al.*, 1998). Les HDL ont été classées en sous-classes en fonction de leur composition lipidique et protéique : les HDL 2 de densité comprise entre 1.063 et 1.125 et les HDL 3 de densité comprise entre 1.125 et 1.121. Il a été rapporté également des pré- β HDL pauvres en lipides dont il existe plusieurs sous-classes (pré- β 1, pré- β 2 et pré- β 3 HDL). Ces particules sont les précurseurs des HDL et contiennent de 2 à 10 % de l'apo A1 plasmatique.

2.2. Transport des lipides et métabolisme des lipoprotéines

(pour une revue, voir Corvilain, 1997)

2.2.1. La voie exogène

Le transfert des lipides alimentaires vers les tissus est la voie métabolique exogène du transport des lipides plasmatiques (Figure I.8).

Environ 120 g de triglycérides et 0,5 à 1 g de cholestérol sont ingérés quotidiennement. Dans la lumière intestinale, ces lipides complexes sont d'abord hydrolysés par les enzymes pancréatiques. Le cholestérol libre, les acides gras, les monoglycérides et les diglycérides libérés au cours de ces réactions, forment des micelles solubles en présence d'acides biliaires. Ces lipides sont ensuite absorbés dans la partie proximale du jéjunum. Presque tous les acides gras et environ 50 % du cholestérol sont ainsi absorbés puis estérifiés dans les entérocytes où ils entrent dans la composition des chylomicrons.

Les chylomicrons formés sont sécrétés au pôle basal des entérocytes et se retrouvent dans une lymphe riche en lipides, appelée chyle. Ils vont ensuite rejoindre la circulation sanguine au niveau de la veine cave supérieure par l'intermédiaire du canal thoracique.

Dans la circulation, les chylomicrons captent des apolipoprotéines complémentaires, l'apolipoprotéine E et les apolipoprotéines C, à partir d'autres lipoprotéines, notamment les HDL. Une enzyme présente en surface des cellules endothéliales et utilisant l'Apo CII comme

cofacteur, la lipoprotéine lipase (LPL), va hydrolyser progressivement les triglycérides des chylomicrons. Ces derniers se transforment alors en des particules de plus petite taille, plus denses, relativement plus riches en protéines, cholestérol et phospholipides. Les chylomicrons résiduels de diamètre très réduit (400 à 600 Å) sont rapidement épurés par le foie (70 %), mais également par d'autres tissus tels que la moëlle osseuse ou le muscle. La fixation et l'endocytose des chylomicrons résiduels par les hépatocytes se font par le biais du récepteur LRP (LDL receptor related protein) et du récepteur à l'apo E (Yu *et al.*, 2001). Après dégradation des chylomicrons dans les hépatocytes, les esters de cholestérol d'origine alimentaire peuvent être convertis en sels biliaires ou être utilisés pour la synthèse d'autres lipoprotéines. Ce processus métabolique est rapide, le temps de résidence des chylomicrons dans la circulation est d'environ 5 minutes.

2.2.2. La voie endogène

L'approvisionnement en lipides des organes périphériques, notamment hors de la période post-prandiale, est assuré par les very low density lipoproteins (VLDL) (Figure I.8).

Les VLDL sont synthétisées au niveau hépatique à partir de lipides stockés ou synthétisés par le foie et d'apo B100 sous l'action de la MTP (microsomal triglycérade transfer protein) (Gibbons *et al.*, 2004). Les VLDL vont, comme les chylomicrons, capturer d'autres apolipoprotéines à partir des HDL, notamment l'Apo CII et l'Apo E. La digestion progressive des triglycérides par la lipoprotéine lipase va fournir des acides gras aux tissus et va conduire à la formation de VLDL résiduels, aussi appelées IDL (Intermediate Density Lipoprotein). Ces IDL peuvent soit retourner au foie, où elles seront endocytées via le récepteur LRP, soit continuer le processus de digestion des triglycérides. Celui-ci ne se fait plus par la lipoprotéine lipase mais par la lipase hépatique (HL), enzyme se trouvant en surface des hépatocytes, dans l'espace de Disse. Au cours de ce processus de digestion, les IDL vont également s'enrichir en esters de cholestérol, cédés par les HDL grâce à la CETP (cholesterol ester transfer protein) (Krause et Auerbach, 2001). Ces différentes modifications conduisent à la formation des LDL. On considère donc que les VLDL sont les précurseurs des LDL.

Ces LDL ont comme fonction de distribuer des esters de cholestérol vers les organes périphériques et le foie via le récepteur aux LDL. Après endocytose et dégradation lysosomale des LDL par les hépatocytes, le cholestérol libéré peut être utilisé pour la biosynthèse des membranes ou comme précurseur des stéroïdes, stocké sous forme de cholestérol estérifié, ou encore exporté dans les VLDL ou dégradé en acide cholique, précurseur des sels biliaires.

Rappelons qu'en excès, les LDL, riches en cholestérol, ont tendance à s'accumuler sous l'endothélium et à s'oxyder. Elles sont alors captées par des macrophages présents dans la paroi vasculaire. Ce processus entraîne la formation de dépôts lipidiques dans les artères, première étape dans la formation de la plaque d'athérome.

2.2.3. Le transport inverse

Les HDL sont générées au niveau hépatique et intestinal par la synthèse des apo AI et AII. La lipodation des apo A par le transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette, sous famille A membre 1) permet la formation de HDL naissantes qui sont les accepteurs préférentiels du cholestérol cellulaire. Le transporteur ABCA1 permet l'efflux du cholestérol excédentaire des tissus périphériques, en particulier des macrophages de la paroi vasculaire, vers les HDL naissantes (Krause et Auerbach, 2001). Les HDL ont donc pour rôle de ramener le cholestérol en excès à la périphérie vers le foie. Les HDL captent le cholestérol libre en surface des

cellules, probablement après fixation par des récepteurs spécifiques. Le cholestérol libre stocké en périphérie des HDL sera estérifié sous l'action de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) qui utilise l'Apo AIV et l'Apo C comme cofacteurs. L'ester de cholestérol, hydrophobe, pénètre alors au cœur de la particule, libérant en surface des sites permettant la capture de nouvelles molécules de cholestérol libre. Les HDL servent donc de pompes à cholestérol pour les tissus périphériques.

Les esters de cholestérol des HDL sont soit captés sélectivement par le foie au niveau du récepteur SR-B I (Scavenger receptor class B type I), soit transférés vers les lipoprotéines à apolipoprotéines B par la CETP (Krause et Auerbach, 2001) (Figure I.9.). L'hydrolyse par la lipase hépatique des phospholipides et triglycérides des HDL favorise la capture sélective des esters de cholestérol.

La déplétion en lipides des HDL par la lipase hépatique et SR-B I permet un recyclage de l'apoA-I donnant naissance à de nouvelles HDL naissantes.

2.3. Les LDL et leurs modifications

2.3.1. Les LDL

Les LDL peuvent être décrites comme des particules sphériques contenant des esters de cholestérol et des triglycérides dans un cœur particulaire recouvert par les extrémités hydrophobes de phospholipides et de cholestérol libre. Les parties hydrophiles des phospholipides s'associent à des protéines (apolipoprotéines) et occupent la surface des LDL (Figure I.10.) (Kirchhausen *et al.*, 1980).

Les LDL transportent le cholestérol du foie vers les cellules périphériques. Elles se fixent à ces cellules par l'intermédiaire des récepteurs aux LDL (LDL-R). Elles pénètrent ainsi dans les cellules où elles sont dégradées et où elles délivrent leur cholestérol (Hussain *et al.*, 1999). L'arrivée du cholestérol libre dans la cellule permet l'autorégulation de la synthèse cellulaire du cholestérol. En effet, l'HMG-CoA réductase cellulaire, qui contrôle cette synthèse, est inhibée par le cholestérol lui-même (feed-back négatif). L'entrée du cholestérol est également autorégulée. Sa présence en excès entraîne d'une part l'arrêt de la synthèse de nouveaux récepteurs aux LDL, d'autre part l'activation de l'acyl-cholestérol-acyl-transférase (ACAT) assurant la ré-estérification du cholestérol libre intracellulaire, stocké sous forme de gouttelettes lipidiques.

2.3.2. Le récepteur aux LDL

Le récepteur aux LDL (LDL-R) fait partie d'une famille comprenant, en plus de celui-ci, le LDL-receptor-related protein (LRP), la mégaline, le very-low-density lipoprotein receptor (VLDL-R) et l'apolipoprotéine E receptor-2 (ApoER2). Tous ces récepteurs faisant partie de la famille des récepteurs aux LDL, ont des motifs structurels communs qui les rendent capables de reconnaître les LDL (Figure I.11). Cependant, ces récepteurs ont d'autres fonctions que l'internalisation cellulaire des LDL. Il a été montré que le LRP était capable de lier des inhibiteurs de protéases tels l' α 2-macroglobuline, des protéases, des lipases et d'autres macromolécules fonctionnellement diverses. La mégaline, exprimée abondamment en surface des cellules épithéliales des tubes proximaux du rein, est capable de lier la vitamine D binding protein (DBP), ainsi que la rétinol binding protein (RBP). Ce récepteur permet donc de récupérer la vitamine D et le rétinol qui se trouvent dans l'urine primaire. De plus, les membres de la famille des récepteurs aux LDL peuvent être impliqués directement dans la transduction transmembranaire de signaux extracellulaires, résultant en l'activation de protéines kinases intracellulaires. Le VLDL-R et l'ApoE-R2 pourraient notamment être des

récepteurs intervenant dans la migration des neurones lors du développement du cerveau (Willnow *et al.*, 1999).

La principale fonction du récepteur aux LDL reste cependant de fournir du cholestérol aux cellules via une endocytose médiée par des récepteurs.

Le premier ligand de ces récepteurs sont les LDL, qui se lient via leur copie unique de l'apoprotéine B-100 et transportent approximativement 65-70 % du cholestérol plasmatique chez l'homme. Les LDL-R lient aussi les VLDL par reconnaissance de l'apolipoprotéine E.

Le LDL-R est localisé sur la membrane cellulaire externe, principalement dans des puits tapissés de clathrine. La liaison de LDL aux récepteurs va provoquer leur rassemblement et l'internalisation des LDL dans des vésicules tapissées de clathrine. Dans la cellule, ces vésicules sont débarrassées de leur manteau de clathrine et leur milieu est acidifié, générant progressivement des endosomes. Dans ceux-ci, les LDL vont se dissocier de leurs récepteurs. Les récepteurs libres retournent à la membrane plasmique alors que les lipides et protéines des LDL vont être dégradés dans les lysosomes (Figure I.12.) (Rudenko et Deisenhofer, 2003).

Le LDL-R comprend 5 domaines structuraux (Figure I.13.) : le domaine N-terminal de liaison au ligand, tandis que les 4 autres domaines servent à l'internalisation du ligand lié au récepteur. Des mutations au niveau du gène encodant le LDL-R entraînent l'hypercholestérolémie familiale, avec des taux de LDL extrêmement élevés dans le sang. Ces personnes sont dès lors prédisposées à l'athérosclérose et aux attaques cardiaques, de manière précoce.

2.3.3. Modifications des LDL

Comme expliqué précédemment, lorsque les LDL infiltrent l'intima, elles s'oxydent progressivement et la reconnaissance par leur récepteur spécifique n'est plus possible. Quand l'oxydation altère les apoprotéines B et E, l'internalisation cellulaire des lipoprotéines modifiées se fait par l'intermédiaire de récepteurs dits 'scavengers' présents sur les macrophages (Figure I.14.). Ces récepteurs ne sont pas régulés par le cholestérol. Nous allons détailler dans les paragraphes suivants les modifications biochimiques que peuvent subir les LDL.

2.3.3.1. Oxydation

1. Rétention des LDL

Nous avons vu que l'événement initiateur du développement de la plaque d'athérome était la pénétration de LDL dans l'intima. À ce niveau, les LDL vont subir des transformations biochimiques, notamment leur liaison aux composants de la sous-endothéliale (Camejo *et al.*, 1991) et leur oxydation.

La traversée de l'endothélium vasculaire par les LDL initie le processus d'athérogénèse. C'est dans cette étape que le profil sanguin des LDL a le plus d'impact. La pénétration des LDL dans la sous-endothéliale est en effet, inversement proportionnelle à leur taille, ce qui fait jouer aux LDL petites et denses, un rôle prépondérant.

La matrice intimale normale contient des héparanes sulfates, protéoglycans produits par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses de la média.

Dans le processus d'athérosclérose, il y a modification de la synthèse des protéoglycans par les cellules musculaires lisses (CML) (Tao *et al.*, 1997) et par les cellules endothéliales. On note par exemple une diminution de la synthèse des protéoglycans à héparanes sulfates (HSPG) (Yamamoto *et al.*, 2005) et une augmentation des protéoglycans à chondroïtines sulfates (CSPG) (Lindholm *et al.*, 2005).

Les HSPG sont inhibiteurs de la prolifération des CML (Herman, 1990). Ainsi la diminution de leur synthèse pourrait concourir à la prolifération des CML au cours de l'athérogénèse. L'augmentation de synthèse et les modifications des CSPG, ont une conséquence directe sur leur interaction avec les LDL : leur affinité pour les apoprotéines B-100 et E est augmentée (Olsson *et al.*, 2001).

On avait observé depuis longtemps, *in vivo*, les interactions entre LDL et CSPG. Camejo *et al* (1988), ont démontré que cette interaction était spécifique aux LDL et dépendante de l'Apo B-100. On sait aussi que ces interactions des lipoprotéines avec les protéoglycans favorisent leur oxydation et, par conséquent, leur capture par les macrophages par un mécanisme d'endocytose non saturable par le biais des récepteurs 'scavengers'. En outre, elles induisent au sein des macrophages une augmentation de la synthèse d'esters de cholestérol (Hurt-Camejo, 1992). Il apparaît que la capture de lipoprotéines au niveau intimal ne concerne pas seulement les LDL, mais aussi les VLDL et certaines VLDL résiduelles (Nordestgaard, 1996).

2. Mécanismes d'oxydation des LDL

Les LDL natives sont habituellement capturées par les cellules par l'intermédiaire des récepteurs aux LDL auxquels elles se lient au travers d'un site de liaison porté par l'Apo B (Yang *et al.*, 1986). Ces récepteurs, bien que présents sur les macrophages, ne semblent pas impliqués dans le processus d'athérogénèse. En effet :

- les sujets déficients en LDL-R peuvent développer une plaque d'athérome ;
- même en présence de grandes quantités de LDL, un macrophage (ou une cellule musculaire lisse) exprimant ce récepteur, ne se transforme pas en cellule spumeuse (Kruth *et al.*, 1999).

D'autres observations ont aussi montré la difficulté de conversion d'un macrophage en cellule spumeuse en présence de LDL natives. En effet, les macrophages expriment un nombre limité de récepteurs pour les LDL natives et ces récepteurs subissent un rétrocontrôle en présence de concentrations élevées de LDL (Van Lenten *et al.*, 1983).

Ceci indique que la pénétration de LDL au niveau de l'intima ne suffit pas pour initier la formation d'une plaque d'athérome. Les LDL doivent subir des modifications pour être reconnues par des récepteurs spécifiques, les récepteurs dits 'scavengers', et devenir athérogènes.

L'oxydation des LDL constitue donc une étape déterminante pour la poursuite du processus d'athérogénèse. *In vitro*, l'oxydation des LDL est initiée par une variété d'agents oxydants, qu'ils soient radicalaires (O_2^- , OH) ou pas (H_2O_2 , ONOOH). Plusieurs études ont tenté de déterminer les agents oxydants contribuant aux processus oxydatifs dans les lésions athérosclérotiques. Des approches moléculaires sur modèles murins d'athérosclérose, telles que l'utilisation de souris déficientes en une enzyme produisant des molécules oxydantes, ont permis d'en savoir plus sur l'origine et la nature des modifications oxydatives durant l'athérosclérose. Par exemple, il existe des preuves convaincantes de la participation de la myéloperoxydase et des oxydants produits par cette enzyme (HOCl, NO_2Cl , radicaux tyrosyl) (Figure I.15.) (Stocker et Keaney, 2004). Il est aussi probable que la source des radicaux libres soit intracellulaire. Mais les enzymes responsables ne sont pas encore précisément connues, même si certaines, comme la 15-lipoxygénase et la NADPH oxydase apparaissent comme des candidats potentiels (Aviram *et al.*, 1996).

On prête aux LDL oxydées (oxLDL) de nombreuses propriétés proathérogènes, mais toutes n'ont pas été validées *in vivo*. On sait que les LDL oxydées :

- ont un effet chimiotactique propre pour les monocytes et les lymphocytes T (Ross, 1995) ;
- sont cytotoxiques pour les cellules endothéliales (Sevanian *et al.*, 1995) ;
- sont cytotoxiques pour les macrophages (Hakamata *et al.*, 1998) et les CML (Cabre *et al.*, 2003), provoquant la mort des cellules spumeuses et la formation d'un noyau lipidique acellulaire au niveau de l'intima
- augmentent la formation de lysophosphatidylcholine (LPC), composant majeur des LDL oxydées, qui provoque la migration des CML vers l'intima (Kohno *et al.*, 1998).

In vitro, l'oxydation des LDL les rend effectivement athérogènes : formation des cellules spumeuses, avec induction de la production de cytokines proinflammatoires, De plus, leur présence au niveau des lésions athérosclérotiques et la diminution du risque d'infarctus du myocarde par les antioxydants ne laissent aucun doute quant au rôle des oxLDL. Néanmoins, un certain nombre d'observations ne sont pas entièrement en accord avec cette théorie. Des analyses biochimiques, par exemple, n'ont pas confirmé la présence de grandes quantités de lipides oxydés dans les lipoprotéines au sein des lésions athérosclérotiques : moins de 0,6 % des acides gras isolés à partir des lésions précoces sont oxydés (Torzewski *et al.*, 1998).

Sans remettre totalement en cause le rôle des oxLDL, Torzewski *et al.* (1998) ont émis l'hypothèse que les LDL ne devaient pas obligatoirement être oxydées pour devenir athérogènes.

Les modifications enzymatiques des LDL, plus encore que leur oxydation, pourraient être responsables des dépôts de lipoprotéines et de l'initiation de l'athérosclérose. S'il est incontestable que l'oxydation des LDL joue un rôle dans l'athérogénèse, la faible quantité de oxLDL détectée au niveau de la plaque laisse supposer que celles-ci jouent un rôle surtout dans la phase précoce de contact et de pénétration.

3. Les différentes LDL oxydées

Les processus d'oxydation des LDL sont des phénomènes excessivement complexes. La partie protéique et la partie lipidique de la particule peuvent être oxydées.

Il existe une grande variété de particules correspondant aux LDL oxydées (oxLDL). Outre leur diversité structurale, les oxLDL sont caractérisées par des différences fonctionnelles. On distingue :

1. Les *mm-LDL* (minimally modified LDL) est un terme utilisé pour décrire des LDL faiblement oxydées dans leur fraction lipidique. Celles-ci sont toujours reconnues par les récepteurs aux LDL natives et pas par les récepteurs 'scavengers' des macrophages. Elles sont bioactives et par exemple, sont capables de stimuler la libération de MCP-1 par les cellules endothéliales (Xiao *et al.*, 1999).

2. Les *MM-LDL* (mildly modified LDL) stimulent la sécrétion, par les cellules endothéliales, de M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) et de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) qui facilitent le recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages tissulaires (Maier *et al.*, 1996). De plus, elles augmentent l'expression des récepteurs 'scavengers' des macrophages et des cellules musculaires lisses (Mietus-Snyder *et al.*, 2000). Les MM-LDL ont aussi un effet prothrombotique car elles stimulent l'expression du facteur tissulaire et participent ainsi à la formation du thrombus.

3. Les *oxLDL* (oxidized LDL) sont oxydées au niveau de la fraction lipidique et de la fraction protéinique. Elles sont cytotoxiques et conduisent à la formation de cellules spumeuses.

In vitro, il existe de nombreuses méthodes d'oxydation des LDL : chimique en présence de CuSO_4 , enzymatique en présence de myéloperoxydase, ou encore en présence de cellules, parmi d'autres.

2.3.3.2. Acétylation

Bien qu'il ait été montré que l'acétylation des LDL ne se passe pas en conditions physiologiques (Han *et al.*, 1997), les LDL acétylées sont couramment utilisées dans l'étude de l'athérosclérose. Des études *in vitro* ont montré que les LDL acétylées (acLDL) sont capables de se lier aux récepteurs 'scavengers' des macrophages (voir point 2.3.3.3.) avec une grande affinité et d'être internalisées par ceux-ci (Coetzee et Chait, 1983). Il en résulte une accumulation excessive d'esters de cholestérol, menant aux cellules gorgées de lipides caractéristiques des lésions de l'athérosclérose. Il a aussi été montré que les acLDL, par liaison aux récepteurs scavengers, entraînent l'activation de tyrosine kinases et de la protéine kinase C (Hsu *et al.*, 2001). Whitman et son équipe (2000) ont également montré, sur des macrophages péritonéaux isolés, que les acLDL augmentent la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et entraînent l'activation de tyrosine kinases cytosoliques et de phospholipases. Dans cette étude, la propagation du signal est inhibée par un traitement à la toxine pertussique, un inhibiteur hautement spécifique des protéines hétérodimériques couplées au GTP (protéines G) de la famille des Gi/o. Ceci démontre donc un lien entre les récepteurs 'scavengers' et l'activation de protéines G sensibles à la toxine pertussique.

Les LDL acétylées sont donc capables, en se liant aux récepteurs 'scavengers' et via l'activation de protéines G, d'induire des cascades de transduction du signal dans les macrophages.

2.3.3.3. Récepteurs aux LDL modifiées

Les effets les plus importants des oxLDL sont, de par leurs interactions avec leurs récepteurs, de contribuer à l'apparition de stries lipidiques par formation de cellules spumeuses. Les cellules spumeuses sont des cellules dérivées de CML ou de macrophages et surchargées d'esters de cholestérol. Leur formation est liée à une capture excessive de oxLDL par des récepteurs spécifiques, les récepteurs 'éboueurs' ou 'scavengers'

En 1979, Goldstein et son équipe ont décrit pour la première fois un récepteur exprimé par les macrophages permettant l'internalisation et la dégradation des acLDL, produisant un dépôt de cholestérol intracellulaire massif. Ce récepteur, tout d'abord appelé récepteur aux acLDL, fait en fait partie de la famille des récepteurs 'scavengers'. Cette famille comprend au moins 6 classes de récepteurs (Tableau I.3) intervenant toutes dans l'internalisation de LDL modifiées. Les récepteurs 'scavengers' intervenant principalement dans l'athérosclérose appartiennent à la classe A et B. Depuis peu, il a également été montré que LOX-1, un récepteur 'scavenger' exprimé par les cellules endothéliales, semble jouer un rôle important dans l'athérogenèse. Nous nous limiterons donc à décrire ces 3 classes de récepteurs.

1. Les récepteurs 'scavengers' de classe A : SR-A I et SR-A II

Les récepteurs 'scavengers' de classe A type I (SR-A I) et II (SR-A II) sont deux variants générés par épissage alternatif du même gène. Ces SR-A sont des glycoprotéines trimériques transmembranaires composées de 6 domaines (Figure I.16. et I.17.). Il a été montré que le domaine 'collagen-like' est le site d'interaction du récepteur avec les LDL modifiées.

Les deux SR-A sont principalement exprimés par les macrophages. Lorsque les monocytes sont stimulés avec du M-CSF, celui-ci induit l'activation d'une protéine kinase C, qui va activer AP-1. Ce facteur de transcription peut alors se lier aux promoteurs de ses gènes cibles, dont le gène SR-A, et induire leur transcription.

Les SR-A contribuent donc au développement de l'athérosclérose via la reconnaissance et l'internalisation des LDL modifiées par les macrophages, formant des cellules spumeuses. De plus, il a été montré que les SR-A sont importants pour le recrutement et la rétention des macrophages dans le tissu et qu'ils sont capables de moduler l'activation de ceux-ci dans la plaque d'athérome. En réponse à cette activation, les macrophages sécrètent de nombreuses cytokines agissant sur les cellules endothéliales, les CML, et les macrophages eux-mêmes qui sont présents dans la lésion (de Winther *et al.*, 2000).

2. Les récepteurs 'scavengers' de classe B

2.1. CD 36

En 1993, Endemann et son équipe ont pour la première fois identifié CD 36 comme un récepteur aux LDL oxydées potentiel. Depuis, plusieurs ligands de ce récepteur ont clairement été identifiés : les oxLDL, modifiées au niveau des lipides et de l'Apo B-100, mais aussi les mmLDL, à la différence des récepteurs de classe A, les cellules apoptotiques, les LDL modifiées par la myéloperoxidase, les acides gras à longues chaînes, ...

D'un point de vue structurel, CD 36 est une protéine fortement N-glycosylée, comportant deux régions transmembranaires, une à chaque extrémité. La majeure partie de cette protéine est extracellulaire, seules 2 queues de 9 et 13 acides aminés sont cytoplasmiques (Figure I.18.).

Des études sur des souris déficientes pour CD 36, ont permis de montrer le rôle critique de ce récepteur dans la formation des cellules spumeuses. En effet, les macrophages de ces souris n'internalisent que peu de oxLDL, et par conséquent, ne forment quasi pas de cellules spumeuses.

L'expression du récepteur 'scavenger' CD 36 est hautement régulée dans les monocytes. Il est notamment surexprimé après stimulation de ceux-ci avec du M-CSF, du GM-CSF, des LDL natives ou modifiées, et lors de l'adhérence des monocytes sur l'endothélium. Par contre, les HDL ou le TGF- β 1 provoquent sa sous-expression. Toutefois, un régulateur critique de l'expression de CD 36 est le PPAR α un récepteur nucléaire. Les ligands de ce récepteur, notamment les produits d'oxydation des LDL tels que le 9-HODE et le 13-HODE, induisent sa dimérisation avec RXR et sa translocation dans le noyau. À ce niveau, PPAR α va induire l'expression de ses gènes cibles, dont CD 36 et PPAR α . Ce rétro-contrôle positif engendre un cycle d'accumulation des oxLDL dans les macrophages et mène donc à la formation de cellules spumeuses (Figure I.19.) (Febbraio *et al.*, 2001).

2.2. SR-B I

Le récepteur 'scavenger' de classe B type I (SR-B I) est une protéine de 509 acides aminés contenant un domaine hydrophobe transmembranaire à chaque extrémité et un grand domaine extracellulaire comprenant de nombreux sites de glycosylation (Figure I.18.). Il se trouve exprimé à la surface de nombreux types cellulaires.

SR-B I est le premier médiateur du transfert sélectif des lipides des HDL aux cellules. Ce récepteur est non seulement capable de lier des lipoprotéines modifiées (oxLDL, acLDL) mais aussi des lipoprotéines dans leur état natif, comme les HDL, les LDL et les VLDL.

Ce récepteur de haute affinité pour les HDL permet la liaison de celles-ci aux cellules et le transfert sélectif de cholesteryl ester dans les cellules indépendamment de l'internalisation de toute la lipoprotéine. Il permet également l'efflux de cholestérol des cellules. Par ce mécanisme, SR-B I constitue une certaine protection contre l'athérosclérose. En effet, une surexpression de ce récepteur a pour conséquence de diminuer la concentration plasmatique en cholestérol, d'augmenter la 'clearance' des esters de cholestérol des HDL et d'augmenter la concentration en cholestérol dans la bile. De plus, SR-B I empêche l'accumulation de lipoprotéines athérogènes dans le plasma (Trigatti *et al.*, 2003).

3. LOX-1

Le récepteur LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor -1) (Figure I.18) est un récepteur 'scavenger' exprimé par les cellules endothéliales qui peut provoquer un dysfonctionnement de l'endothélium, et, par conséquent, contribuer au développement de lésions athérosclérotiques. LOX-1 est capable de lier et d'internaliser les LDL oxydées, mais aussi de médier leur dégradation. Contrairement aux récepteurs 'scavengers' de classe A, il n'est pas capable de lier les LDL acétylées.

L'expression de LOX-1 n'est pas constitutive, mais peut être induite par des stimuli pro-inflammatoires tels que le TNF- α et le TGF- β , par des forces de cisaillements ('shear stress'), ou par les oxLDL elles-mêmes (Kume et Kita, 2001). Il a également été montré que la stimulation de cellules endothéliales par des anions superoxide ($O_2^{\cdot-}$) augmente l'expression du gène codant LOX-1 au niveau ARNm (Nagase *et al.*, 2001). Cette régulation par un agent oxydant suggère un rôle potentiel pour LOX-1 dans l'athérosclérose.

LOX-1 serait également capable de lier les monocytes, favorisant le recrutement de ceux-ci dans la lésion athérosclérotique (Hayashida *et al.*, 2002). De plus, LOX-1 serait également exprimé sur les macrophages et les cellules musculaires lisses dans les lésions de l'athérosclérose (Kume et Kita, 2001).

2.4. Effets des LDL oxydées sur les macrophages

2.4.1. D'un point de vue phénotypique

Il a déjà été signalé plusieurs fois que l'internalisation excessive et non contrôlée de LDL oxydées par les récepteurs 'scavengers' des macrophages va conduire à la formation de cellules spumeuses, qui, en s'accumulant au niveau de l'intima vont former un noyau lipidique, le centre athéromateux. Les récepteurs 'scavengers' CD36 et SRA sont les récepteurs principaux responsables de la conversion des macrophages en cellules spumeuses.

Phénotypiquement, les cellules spumeuses sont des cellules gorgées de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques contenant des esters de cholestérol.

2.4.2. D'un point de vue moléculaire

Les LDL oxydées ont des effets sur l'expression de certains gènes au sein des macrophages. Nous avons déjà signalé qu'elles induisent la surexpression du récepteur 'scavenger' CD36 via l'activation du récepteur nucléaire PPAR α . Ce sont au fait le 9-HODE et le 13-HODE, deux produits d'oxydation des LDL, qui sont les ligands et activateurs de PPAR α . Celui-ci est, par ailleurs, aussi surexprimé lorsque les macrophages sont stimulés avec des LDL oxydées (Febbraio *et al.*, 2001). Par conséquent, de plus en plus de oxLDL sont internalisées par les macrophages.

Les oxLDL provoquant une réaction inflammatoire, elles induisent également l'expression de gènes impliqués dans cette réaction. Il a été montré que les LDL oxydées induisent, dans les macrophages, la surexpression de l'IL-12 (Varadhachary *et al.*, 2001) et la sous-expression du récepteur au 'platelet activating factor' (PAF) (Hourton *et al.*, 2001).

De plus, le stress oxydatif causé par les LDL oxydées va modifier l'expression de gènes intervenant dans les défenses anti-oxydantes. Une partie de ces gènes possède, dans leurs promoteurs, un ou plusieurs sites 'antioxydant response element (ARE)'. Ces sites ARE, aussi dénommés 'electrophile response element (EpRE)', sont reconnus notamment par le facteur de transcription Nrf-2 (NF-E2 related factor 2). Or il a été montré que Nrf-2 joue un rôle critique dans les réponses à des stress oxydatifs générés par les ROS, les xénobiotiques, certains carcinogènes chimiques, certaines molécules électrophiles capables de réagir directement avec des groupes sulfhydryl (isothiocyanate, diethyl maleate, ...), ou encore des molécules électrophiles capables de réagir avec des groupes sulfhydryl après métabolisation. C'est le cas de la β -naphthoflavone qui doit d'abord être métabolisée en un intermédiaire de type quinone.

Un stress oxydatif provoque l'activation du facteur de transcription Nrf-2, qui, après dimérisation avec une protéine Maf, va se fixer aux sites AREs et provoquer l'induction de gènes impliqués dans les défenses antioxydantes.

Différentes cascades de transduction du signal menant à l'activation de Nrf-2 ont été proposées. Pour le moment, 3 voies semblent impliquées dans la régulation des gènes contenant un ou des sites ARE : la voie des MAPK, la voie des PI3K, et celle des PKC.

Il semble qu'il existe un réseau très ordonné de mécanismes de transduction du signal qui permet de réguler les gènes contenant des AREs de manière appropriée (Nguyen *et al.*, 2003) (Figure I.20.).

Pour le moment, on ne connaît que peu de gènes possédant des sites ARE (glutathione-S-transferase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, ...), mais l'utilisation de techniques génomiques modernes telles que l'analyse sur microdamiers permettra sans doute d'en trouver beaucoup d'autres.

Bea et son équipe (2003) ont notamment montré, par PCR en temps réel, que les LDL oxydées induisaient l'expression de la sous-unité catalytique (Gclc) et régulatrice (Gclm) de la glutamate-cystéine ligase (Gcl), via la liaison du facteur de transcription Nrf-2 aux séquences AREs présentes dans le promoteur de ces deux gènes. La glutamate-cystéine ligase (= gamma-glutamylcystéine synthétase) est l'enzyme régulant la synthèse de glutathion, un anti-oxydant endogène (Figure I.21). Le stress oxydatif causé par les LDL oxydées provoque donc une augmentation compensatoire de la synthèse de glutathion, permettant de lutter contre les molécules oxydantes.

Les LDL oxydées induisent donc des variations d'expression génique d'un nombre considérable de gènes. Une étude sans *a priori* est dès lors indispensable si l'on veut obtenir une vision globale des effets des LDL oxydées sur les macrophages. Pour ce mémoire, c'est l'approche protéomique qui a été choisie.

3. L'APPROCHE PROTEOMIQUE

3.1. Protéomique et transcriptomique

L'étude à grande échelle de l'expression des gènes fait appel à deux approches : d'une part l'analyse du transcriptome constitué par l'ensemble des ARNm présents dans une cellule dans une situation donnée ; d'autre part l'analyse du protéome représenté par les protéines que codent ces ARNm. Leur finalité commune est d'identifier et de quantifier les produits de l'expression des gènes d'une cellule ou d'un tissu à un instant et dans un environnement donné, dans un but de comparaison entre différents états biologiques.

3.1.1. La transcriptomique

L'étude du transcriptome est aujourd'hui rendue très accessible grâce à des méthodologies bien maîtrisées et au large spectre d'application. L'analyse du transcriptome à grande échelle est possible grâce à la technique des puces à ADN ou 'microarrays'. Celles-ci sont utilisées pour identifier et quantifier la sur- ou sous-expression d'un ensemble de gènes dans une situation biologique donnée. L'analyse d'une masse suffisante de données d'expériences sur puces peut permettre d'identifier des familles et des réseaux fonctionnels de gènes mis en jeu sous l'effet du stimulus étudié, dans certaines pathologies ou encore au cours du développement.

Cependant, les puces à ADN génèrent de nombreux faux positifs. Il est dès lors indispensable de valider les résultats obtenus sur celles-ci, par PCR quantitative en temps réel. Celle-ci permet de mesurer le niveau d'expression d'un gène d'intérêt en déterminant l'abondance de l'ARNm correspondant au sein d'un type cellulaire placé dans différentes situations physiopathologiques.

Cependant, l'expression au niveau des protéines n'est pas corrélée strictement à l'expression transcriptomique (Pradet-Balade *et al.*, 2001). La transcriptomique ne donne aucune information sur les modifications post-traductionnelles.

3.1.2. La protéomique

Les récentes avancées technologiques aussi bien dans la séparation des protéines/peptides que dans les analyses par spectrométrie de masse et les différents programmes de séquençage des génomes et de construction de banques de données, ont permis l'émergence de la protéomique. Celle-ci permet notamment :

- la recherche et l'identification systématique de l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule donnée, dans un organisme ou dans un type de tissu, à un moment donné ;
- l'identification des protéines constituant un complexe protéique (interactions protéines-protéines) ;
- la recherche et l'identification de protéines impliquées dans des voies de signalisation, par exemple par une analyse différentielle (sauvage/mutant ; contrôle/traité).

3.2. La protéomique

L'analyse protéomique peut être séparée en différentes étapes :

1. Préparation des échantillons
2. Séparation des protéines
3. Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, MS/MS, ...)
4. Identification des protéines par interrogation des banques de données

Il existe différentes techniques de séparation des protéines, qui peuvent être classées en deux catégories : les approches protéomiques gel-dépendantes et les approches protéomiques gel-indépendantes.

3.2.1. Les approches protéomiques gel-dépendantes

3.2.1.1. Gels 2D conventionnels

Après avoir extrait les protéines d'un tissu ou de cellules d'intérêts, elles vont être séparées afin d'obtenir théoriquement des protéines isolées. Cette séparation se fait selon deux caractéristiques, tout d'abord selon la charge (IEF : IsoElectric Focusing), et ensuite, selon le poids moléculaire (électrophorèse SDS-PAGE) des protéines. La seconde étape consiste à analyser les gels de deux conditions différentes (contrôle vs traité ; sauvage vs mutant ; sain vs malade) afin de déterminer les protéines dont l'expression est modifiée après traitement. Pour ce faire, les gels doivent être colorés, ce qui permet de visualiser les protéines. Plusieurs types de coloration peuvent être utilisées : la coloration au bleu de Coomassie, la coloration à l'argent, Les spots correspondant aux protéines d'intérêt sont ensuite prélevés pour être identifiés grâce à la spectrométrie de masse (MALDI-TOF, ESI-TOF, MS/MS) et aux banques de données.

Bien que l'électrophorèse bidimensionnelle soit une technique très puissante permettant de séparer des milliers de protéines d'un mélange en une seule étape, elle comporte plusieurs limites :

- La résolution reste insuffisante et il n'est pas rare qu'il y ait comigration de plusieurs protéines et, par conséquent, de retrouver plus d'une protéine dans un même spot. Afin de limiter cette comigration, la résolution des gels peut être améliorée, notamment en restreignant la gamme de pH du gel de 1^{ère} dimension.

- Certaines protéines, telles que les protéines du cytosquelette comme l'actine, sont fortement exprimées par les cellules ($\sim 10^8$ molécules/cellule) alors que d'autres, comme les facteurs de transcription, le sont faiblement ($\sim 10^2$ molécules/cellule). Il existe donc, dans une cellule, des variations d'expression protéique de l'ordre de 10^6 , ce qui dépasse largement le 'dynamic range' des gels bidimensionnels qui est de l'ordre de 10^4 . En conséquence, les protéines de faible abondance sont peu visibles sur les gels. Plusieurs moyens ont été envisagés afin de limiter ce problème, comme par exemple, enrichir les échantillons en protéines moins exprimées ou réaliser l'extraction protéique sur un seul organite.

- Bien que les gels 2D permettent de couvrir une large gamme de pH et de poids moléculaire, vu la grande diversité chimique des protéines, une certaine proportion d'entre elles ne pourront être analysées. Les gels 2D se focalisent sur les protéines ayant un point isoélectrique compris entre 3 et 11, ce qui exclut les protéines très basiques ou très acides. De plus, les protéines de poids moléculaire supérieur à 200 kDa ou inférieur à 15 kDa ne sont généralement pas capturées dans le gel 2^{ème} dimension.

- La séparation en 1^{ère} dimension se faisant selon la charge de la protéine, l'extraction des protéines ne doit pas modifier leurs charges ni les dénaturer. Cela limite les détergents qui peuvent être utilisés pour l'extraction des protéines, et, dès lors, une certaine quantité de protéines peuvent être perdues, car non solubilisées. Les protéines hydrophobes et en particulier les protéines membranaires posent problème.

- Des variabilités existent entre les différents gels. Il est donc difficile de déterminer si les variations observées entre les spots sont dues à des différences biologiques ou à des variations de gel à gel. Afin de minimiser ces variations de gel à gel, il est indispensable de réaliser un certain nombre de gels afin d'établir un gel moyen pour la condition 'contrôle' et la condition 'test', pour ensuite pouvoir les comparer.

- La technique des gels 2D requiert des ressources considérables en termes de budget et de temps, surtout au niveau de l'analyse et de la comparaison des gels.

Une partie de ces problèmes ont été minimisés lors de l'apparition d'une nouvelle technique de gels bidimensionnels, le 2D-DIGE (2D Differential In-Gel Electrophoresis).

3.2.1.2. Le 2D-DIGE

Les trois différences principales entre cette technique et les techniques de gels bidimensionnels conventionnelles sont :

1. Le marquage **pré-électrophorétique** des protéines avec des cyanines.
2. La migration des protéines extraites de différentes conditions dans **un seul gel**.
3. L'utilisation d'un **standard interne**.

La technique 2D-DIGE utilise des sondes fluorescentes de faible poids moléculaire (Cyanine 2, Cyanine 3 et Cyanine 5) pour marquer les protéines avant les électrophorèses. En utilisant des sondes différentes pour marquer séparément des protéines isolées à partir de cellules contrôles et de cellules traitées, les échantillons peuvent migrer dans un seul gel et les protéines de chaque condition peuvent être visualisées individuellement en scannant le gel à différentes longueurs d'ondes. Un mélange d'une même quantité de protéines 'contrôles' et de protéines 'traitées', marqué avec une troisième cyanine, migre également dans le même gel et sert de standard interne (Figure I.22.). Cette approche permet de réduire les désavantages des techniques de gels bidimensionnels traditionnels :

- L'utilisation d'un standard interne, présent dans tous les gels, permet d'éliminer les variations de gel à gel en les normalisant par rapport à l'un d'entre eux, le gel 'master'.

- La résolution des gels en 2D-DIGE ainsi que le programme d'analyse permettent d'identifier des protéines ayant des pI et des PM très proches et qui, dans les gels 2D conventionnels, se trouvent dans le même spot.

- Les gels en 2D-DIGE permettent de détecter des protéines présentes en très faible quantité, de l'ordre de 125 pg.

- Avec une échelle de linéarité de l'ordre de 10⁵, cette technique permet de révéler plus de protéines, à la fois celles fortement exprimées et celles faiblement exprimées, sans atteindre le seuil de saturation pour la quantification.

- Le 2D-DIGE étant beaucoup plus reproductible et fiable que les gels 2D conventionnels, 3 gels sont suffisants afin d'obtenir des résultats significatifs.

- Comme seulement 2 à 3 % des protéines sont marquées avec des cyanines, la majorité d'entre elles ne sont pas modifiées et peuvent être analysées en spectrométrie de masse sans traitement préalable.

Le plus grand inconvénient de cette technique reste le coût, et notamment celui des cyanines. Le tableau I.4 reprend les différentes caractéristiques des méthodes de coloration/détection des protéines en gels 2D conventionnels et en gels 2D-DIGE.

3.2.1.3. L'identification des protéines par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est devenue une approche quasi incontournable dans l'étude et la caractérisation des biomolécules, notamment pour l'étude structurale des peptides et des protéines. La cartographie par mesure des masses moléculaires de mélanges peptidiques obtenus par digestion à la trypsine permet d'identifier une protéine, par comparaison des masses obtenues avec les banques de données.

Cette technique permet de transformer des peptides dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire en analysant leur rapport de masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse est l'appareil qui permet de mesurer ce rapport masse/charge des ions formés à partir de l'échantillon analysé. Il est toujours constitué d'une source d'ions, d'un analyseur, d'un détecteur et d'un enregistreur (Figure I.23).

On distingue plusieurs systèmes de spectrométrie de masse selon la technique d'ionisation et la technique de détection de peptides. Deux techniques de spectrométrie de masse sont principalement utilisées pour l'analyse des protéines et des peptides, il s'agit de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et de l'Electrospray (ESI). Parallèlement à ces techniques d'ionisation, les analyseurs en temps de vol (TOF) ou à filtre quadripolaire ont été développés.

L'analyse de la masse moléculaire des peptides obtenus par digestion à la trypsine des protéines se fait généralement par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Figure I.24). Cette méthode consiste à cocristalliser les peptides sur une cible avec une matrice (la plus courante: l'acide alpha-cyno-4-hydroxycinnamique). Un laser vient frapper la cible et ainsi désorbe la matrice et les peptides qui s'ionisent. L'échantillon ainsi chargé va être accéléré par un champ électrique et voler dans un tube de vol (sous vide). Un détecteur compte la quantité de molécules qui le traverse à un instant donné. Le temps de vol d'une molécule dépend à la fois de sa masse moléculaire et de sa charge, ainsi on peut déterminer le rapport masse/charge (m/z) d'une molécule en fonction de son temps de vol (Schiller *et al.*, 2004).

Lorsque les masses moléculaires des peptides ne permettent pas d'identifier la protéine, on peut avoir recours au séquençage complet d'un de ces peptides. Ce séquençage s'effectue par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), généralement par un spectromètre de masse de type Q-TOF (Figure I.25). Celui-ci consiste à faire passer les peptides ionisés formés dans la source dans un premier analyseur de type quadripôle. Parmi ces peptides ionisés, un ion précurseur est sélectionné sur base du rapport m/z . Seuls les ions ayant le rapport m/z sélectionné pourront sortir du quadripôle. Ils entrent alors dans une zone libre de champ, où est placée une cellule de collision, contenant des molécules de gaz. Les collisions des ions précurseurs avec ces molécules de gaz vont provoquer leur décomposition en ions fragments, en rompant les liens peptidiques. Les rapports m/z de ces fragments sont alors étudiés dans un second analyseur de type temps de vol (Graves et Haystead, 2002). La formation de ces ions fragments suit des règles précises. Les groupes chimiques ont leurs caractéristiques propres de fragmentation, et le profil d'un spectre MS/MS donne en général des informations complètes et fiables sur la structure du composé précurseur et donc sur la séquence primaire du peptide.

3.2.2. Les approches protéomiques gel-indépendantes

Même si dans le cadre de ce mémoire, c'est la méthode 2D-DIGE qui sera utilisée, on ne peut pas passer sous silence les nouvelles approches gel-indépendantes.

Depuis quelques années, d'autres technologies, indépendantes des gels, permettent de réaliser des études protéomiques. Ces nouvelles méthodes de séparation, dites multi-dimensionnelles, sont rapides, puissantes, sensibles, possèdent un haut pouvoir de résolution et donnent des résultats très reproductibles. Elles sont basées sur de la chromatographie en phase gazeuse, de la chromatographie en phase liquide (HPLC) et de l'électrophorèse capillaire couplées entre elles et/ou avec des spectromètres de masses. Le spectromètre de masse sert non seulement à l'identification des peptides issus des protéines de l'échantillon, mais également à la séparation de ceux-ci. De plus, ces techniques-généralisant des quantités de données colossales - requièrent des outils informatiques puissants (Guttman *et al.*, 2004).

Bien que ces techniques dépassent largement le cadre de ce mémoire, deux d'entre elles vont être brièvement décrites.

3.2.2.1. La MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology)

Cette technique se base sur deux chromatographies liquides consécutives, dans un capillaire de silicium. La séparation chromatographique des peptides, issus de la digestion des protéines par une protéase, combine en fait une colonne échangeuse de cations (SCX = strong cation exchange) et une colonne en phase inverse. Le capillaire contenant ces deux colonnes est placé directement au niveau d'une source d'ions d'un spectromètre de masse de type MS/MS, permettant l'identification des peptides élués de la colonne (Rabilloud, 2002) (Figure I.26.).

Cette technologie ne convient cependant pas pour de la protéomique quantitative comparative. En effet, elle ne fournit aucune donnée quantitative sur les protéines identifiées, seule la présence ou l'absence d'une protéine peut être détectée. La MudPIT se prête par contre très bien à l'analyse de protéome complet, y inclus les protéines plus hydrophobes. Elle a notamment été appliquée pour décrire le génome de levure (Washburn *et al.*, 2001).

3.2.2.2. Le marquage aux isotopes stables

Contrairement à la technologie MudPIT, le marquage aux isotopes stables permet de mesurer des variations d'expression protéique de manière quantitative.

Cette méthode est basée sur un marquage différent de protéines extraites de deux conditions distinctes avec des isotopes stables. Après digestion par la trypsine, les peptides des deux conditions sont analysés simultanément. Deux pics pour un même peptide, représentant la différence entre isotopes, vont alors être détectés par spectrométrie de masse. Une quantification relative est mesurée en comparant les aires des pics des peptides identiques mais distincts par le marquage isotopique (Hoang *et al.*, 2003).

Les isotopes stables peuvent être introduits soit durant la croissance cellulaire, c'est-à-dire par un marquage métabolique par la technique SILAC (Stable-Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture), soit après l'extraction protéique.

L'ICAT (isotope coded affinity tag) est une méthode de marquage isotopique post-extraction de plus en plus utilisée. Les petites molécules utilisées dans l'ICAT sont constituées de 3 éléments : - un groupe iodoacétamide qui peut former un lien covalent avec les groupements sulfhydryl libres des résidus cystéines réduits ;

- une région charnière contenant des variants isotopiques soit légers soit lourds ;
- un 'tag' d'affinité (biotine) utilisé pour isoler les peptides marqués par ICAT par chromatographie d'affinité avec de l'avidine.

Pour un marquage ICAT 'traditionnel', la région charnière contient 8 atomes de deutérium (lourd) ou d'hydrogène (léger), permettant de marquer distinctivement les protéines issues de deux conditions différentes. Ceci résulte en une différence de masse de 8 Da entre les peptides marqués au deutérium et les peptides marqués à l'hydrogène. Cette différence est suffisante à l'obtention de deux pics distincts lors de l'analyse simultanée des peptides issus des deux conditions par spectrométrie de masse (Figure I.27.) (Barrier et Mirkes, 2005).

4. OBJECTIFS DU MEMOIRE

La pénétration des LDL dans l'intima, suivi de leur oxydation, constitue une étape précoce de l'athérosclérose. Dans la paroi artérielle, les LDL oxydées engendrent un stress oxydatif et provoquent une réaction inflammatoire. Le stress oxydatif stimule la sécrétion endothéliale de MCP-1 et de M-CSF, menant respectivement à l'adhérence et la différenciation des monocytes. Les LDL présentes dans l'intima se lient aux protéoglycans de la matrice extracellulaire, sécrétée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages, favorisant leur oxydation par les macrophages de la paroi artérielle. Ces oxLDL sont alors internalisées par les macrophages, via les récepteurs 'scavengers'. Ceci conduit à la formation de cellules spumeuses, principales cellules composant la plaque d'athérome, et contribue au développement de l'athérosclérose.

Les macrophages, ainsi que les LDL, jouent donc un rôle primordial dans le développement de l'athérosclérose. Bien que beaucoup d'études aient déjà été réalisées sur les effets des LDL oxydées sur les macrophages, la plupart d'entre elles se focalisent sur une seule protéine. Notre but, dans ce mémoire, est de réaliser une étude plus globale des gènes induits ou réprimés par les oxLDL. Pour ce faire, nous avons opté pour une approche sans *a priori*, la protéomique gel-dépendante.

Avant la réalisation des gels bidimensionnels, il était indispensable :

1. de valider notre méthode d'isolement et d'oxydation des LDL, afin de s'assurer que les macrophages étaient bien stimulés avec des LDL oxydées ;
2. de confirmer que ces oxLDL étaient bien capables d'induire l'expression de gènes dans les macrophages.

Tout d'abord, l'oxydation des LDL sera validée par la réalisation de tests T-BARS (thio-barbituric acid reactive substance). Il s'agit d'un test colorimétrique dans lequel l'acide thio-barbiturique (TBA) réagit avec le malondialdéhyde (MDA), un produit d'oxydation majeur des LDL.

Ensuite, nous confirmerons que les LDL oxydées induisent bien des variations d'expression génique en reproduisant l'expérience réalisée par l'équipe de Bea.(2003). Celle-ci montrait, par PCR en temps réel, une augmentation des transcrits *Gclm* après stimulation des macrophages avec des oxLDL. Cette induction est médiée par l' 'antioxydant response element' présent dans le promoteur de ce gène, reconnu par le facteur de transcription Nrf-2.

Après avoir validé notre modèle cellulaire, nous passerons à l'approche protéomique afin de mettre en évidence des variations d'expression protéique entre des macrophages stimulés ou non aux LDL oxydées. Les protéines présentant des variations d'expression importantes seront ensuite prélevées afin d'être identifiées par spectrométrie de masse. Ces résultats seront ensuite validés par Western Blot.

De plus, bien que l'acétylation des LDL n'ait pas lieu *in vivo*, les acLDL constituent un système expérimental de référence, pour étudier les surcharges lipidiques, sans stress oxydatif. Ce travail constitue donc la première étape d'un travail comparatif plus large visant à comparer les effets des oxLDL et des acLDL sur l'expression génique des macrophages.

Nous espérons trouver, par cette approche, de nouvelles protéines impliquées dans le développement de l'athérosclérose, mais aussi d'identifier à plus long terme celles qui permettent aux macrophages de se protéger contre un stress oxydatif et/ou un stress lipotoxique, et de préciser les rôles respectifs des deux facteurs de transcription Nrf-2 et PPAR α dans ces réponses.

II. MATERIELS ET METHODES

1. CULTURE CELLULAIRE

Le modèle cellulaire utilisé est la lignée des macrophages murins, nommée RAW 264.7. Ces cellules proviennent d'une tumeur induite par le virus de la leucémie murine d'Abelson, chez des souris mâles BALB/c.

1. Matériels

- Macrophages murins RAW264.7 (American Type Culture Collection – ATCC – TIB-71)
- Boîtes de culture stériles de 75 cm² (T75) (Costar)
- Milieu de culture DMEM - HG + 1,5 g/l NaHCO₃ (Gibco – Invitrogen) + 10 % FBS (Gibco)
- Pipettes de 10 ml stériles (Sarstedt)
- Rateau de 30 cm (Techno Plastic Products - TPP)
- Etuve à 37 °C et 5 % CO₂ (Jouan)

2. Méthode

Les cellules sont cultivées dans des T75 et sont repiquées tous les 2 ou 3 jours sous hotte à flux laminaire vertical permettant de travailler dans un environnement stérile.

Les 15 ml de milieu sont décantés. Les cellules sont ensuite raclées dans 6 à 12 ml de milieu préalablement préchauffé à 37 °C, de manière à avoir environ 3 x 10⁶ cellules/ml. 14 ml de milieu sont ajoutés à chaque nouvelle T75 ainsi que 1 ml de suspension cellulaire. Les cellules sont alors incubées dans une étuve à 37 °C et 5 % de CO₂.

2. ISOLEMENT DES LIPOPROTÉINES

Les lipoprotéines sont isolées à partir de sérum ou de plasma humain fourni par le Centre Hospitalier Régional (CHR) de Namur. L'isolement est réalisé par deux ultracentrifugations en gradient de densité permettant dans un premier temps de séparer les lipoprotéines des autres composants du sérum ou du plasma, et dans un second temps, d'isoler les LDL des autres lipoprotéines (HDL et VLDL).

1. Matériels

- | | |
|--|------------------------------|
| - Gants (Mölnlycke Health Care AB) | - Scalpel |
| - Pool de sérum ou de plasma humain (CHR Namur) | - KBr (Merck) |
| - Centrifugeuse Labofuge 400 R (Heraeus) | - EDTA (Merck) |
| - Tubes d'ultracentrifugeuse de 40 ml (Beckman) | - BHT (Merck) |
| - Ultracentrifugeuse LE 80 - T (Beckman) - NaCl (Merck) | - Tris (Merck) |
| - Rotor vertical VTI-50 (Beckman) | - Filtre 0,45 µm (Millipore) |
| - Seringue dotée d'une aiguille 21G (Terumo) | - Pipettes Pasteur (Bilbate) |
| - Cassette de dialyse 'Slide-A-Lyser 10K' 10,000 MWCO (Pierce) | |
| - Système de fermeture thermique des tubes d'ultracentrifugation (Beckman) | |

2. Méthode

La méthode est expliquée ici pour l'isolement de LDL à partir de plasma, en utilisant du BHT comme antioxydant. L'isolement à partir de sérum se fait de la même manière en utilisant de l'EDTA à 100 µM à la place du BHT 25 µM.

Le plasma humain nous est fourni dans des tubes de 50 ml. Ces tubes sont centrifugés 5 minutes à 1.000 rpm afin d'éliminer les globules rouges résiduels. Le surnageant est transféré dans un cylindre gradué préalablement taré, et la densité du plasma est ajustée à 1.25 g/ml avec du KBr. Après homogénéisation, du BHT 25 µM est ajouté au plasma pour éviter

l'oxydation des LDL. Celui-ci est ensuite réparti dans des tubes d'ultracentrifugation à l'aide d'une seringue. Les tubes sont équilibrés, scellés par fermeture thermique et placés dans le rotor vertical. Ils sont alors centrifugés à 48.000 rpm (10 °C) pendant la nuit (environ 16 h). Les lipoprotéines (phase du dessus) sont récupérées à la pipette Pasteur en découpant le dessus des tubes au scalpel (Figure II.1. 1.).

La densité des lipoprotéines récoltées est ajustée à 1.3 g/ml avec du KBr. Dans un nouveau tube d'ultracentrifugation, 30 ml de tampon NaCl 0.9 % - BHT 25 µM sont déposés. Les lipoprotéines sont injectées sous cette couche à l'aide d'une seringue munie d'un fin tuyau. Le tube est équilibré avec du tampon, scellé thermiquement et centrifugé pendant 3 heures à 48.000 rpm, 10 °C.

Lorsque la centrifugation est terminée, le tube est délicatement récupéré et 3 bandes colorées sont bien visibles (Figure II.1.2.). Les LDL (bande centrale de couleur jaune doré) sont récupérées et injectées dans une cassette de dialyse. Elles sont dialysées pendant 2 jours contre un tampon de dialyse pH 7.4 (tableau II.1) changé régulièrement, et finalement filtrées sous hotte à l'aide d'une seringue et d'un filtre 0.45 µm.

3. DOSAGE ET OXYDATION DES LDL

3.1. Dosage des LDL

La concentration des LDL est estimée par un dosage de leur partie protéique par la méthode de Bradford.

1. Matériels

- Plaque 96 puits (Costar)
- Pipette multichannel (Labsystem) + tips (Greiner bio-one)
- Etalon BSA 2 mg/ml (Bovine Serum Albumin) (Pierce)
- Eau milliQ (Millipore)
- Réactif de Bradford (Biorad)
- Spectrophotomètre (Biorad)

2. Méthode

L'étalon protéique BSA est dilué 40 x, sa concentration finale est donc de 50 µg/ml. Les LDL sont, elles, diluées 80 x. Un puits de la première ligne d'une plaque 96 puits est rempli avec 320 µl de l'étalon BSA dilué. Le puits adjacent est rempli avec 320 µl d'eau (blanc) et les 2 puits suivants, avec les LDL diluées (320 µl d'eau – 8 µl d'eau + 8 µl LDL). Dans les 5 lignes suivantes, 160 µl d'eau sont ajoutés. Ensuite, des dilutions de 2 en 2 sont réalisées au moyen d'une pipette multichannel : 160 µl des 320 µl de la première rangée sont prélevés et mélangés avec les 160 µl de la deuxième. Ce procédé est répété jusqu'à la sixième ligne. Finalement, 40 µl de Bradford sont ajoutés à chaque puits, en commençant par la dernière ligne, où les échantillons sont les plus dilués. Après 7 minutes d'incubation à température ambiante, la DO est mesurée à 595 nm. D'après la courbe standard établie avec les valeurs obtenues pour l'étalon BSA, la concentration des LDL peut être estimée.

3.2. Oxydation des LDL

Lors de ce mémoire, les LDL sont oxydées chimiquement par du sulfate de cuivre, méthode couramment utilisée dans la littérature. Les ions cuivre, comme tous les métaux de transition, attaquent les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés des lipoprotéines, ce qui aboutit à un réarrangement intramoléculaire des liaisons insaturées. Ce phénomène conduit à

la formation de diènes conjugués, composés peu stables, qui après réaction avec l'oxygène moléculaire vont former des peroxydes lipidiques.

1. Matériels

- NaCl (Merck)
- K₂HPO₄ (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- BHT (Merck)
- CuSO₄ (Merck)
- Tube en verre fermé hermétiquement
- EDTA (Merck)
- Cassette de dialyse 'Slide-A-Lyser 10K' 10,000 MWCO (Pierce)

2. Méthode

Les LDL natives sont dialysées contre du PBS (tableau II.2) 3 x 30 minutes et 1 x 1 heure. Elles sont ensuite oxydées avec du CuSO₄ 10 µM pendant 24 heures à 37 °C dans un tube en verre fermé hermétiquement. Ensuite, les LDL oxydées sont dialysées contre du PBS + BHT 25 µM pendant 3 x 45 minutes afin de stopper la réaction d'oxydation.

3.3. Mesure de l'oxydation des LDL

Afin d'évaluer le degré d'oxydation des LDL oxydées chimiquement au sulfate de cuivre, nous avons mesuré la quantité de malondialdéhyde (MDA), un produit d'oxydation des LDL, dans des échantillons de LDL natives, de LDL acétylées et de LDL oxydées. Pour ce faire, nous avons réalisé un test T-BARS (Thio-Barbituric Acid Reactive Substance), test colorimétrique permettant de calculer la quantité de MDA dans les échantillons à partir d'une droite standard. Celle-ci est réalisée par mesure de densité optique de différentes dilutions d'une solution contenant du MDA, généré par hydrolyse acide de TMP (1,1,3,3-tétraméthoxypropane).

1. Matériels

- Eau milliQ (Millipore)
- HCl 0,01 M (Merck)
- TCA (acide trichloroacétique) (Merck)
- TBA (acide thio-barbiturique) (Merck)
- TMP 6 M (1,1,3,3-tétraméthoxypropane)(Sigma-Aldrich)
- NaOH 0,3 N (Merck)
- Microtubes (Sarstedt)
- Bloc chauffant à 90 °C (Techne Dri-Block)
- Spectrophotomètre (Biorad)

2. Méthode

La solution stock de TMP est diluée dans l'eau afin d'obtenir une solution à 100 mM final. 50 µl de cette solution sont ajoutés à 10 ml d'HCl 0,01 M afin de générer une solution stock de MDA à 500 µM. On incube 10 minutes à température ambiante avant d'effectuer les différentes dilutions permettant de réaliser la courbe standard (500 µM, 400 µM, 300 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM et 0 µM en MDA).

Deux points de mesures sont réalisés pour chaque concentration de la courbe standard et pour les échantillons. Pour ce faire, on place dans des microtubes :

- 500 µl de TBA 1 % dans du NaOH 0,3 N ;
- 500 µl de TCA 20 % ;
- 250 µl d'eau ;
- 25 µl d'échantillons ou de dilutions de la solution MDA.

Les microtubes, après avoir été fermés avec des 'capuchons', sont placés 30 minutes à 90 °C. On les laisse ensuite refroidir quelques minutes sur glace avant de les amener à température ambiante. Ils sont ensuite centrifugés 10 minutes à 2500 rpm afin d'éliminer les protéines qui ont précipité. Le surnageant est donc récolté et on lit sa densité optique (DO) à

d'acétate de sodium sont ajoutés. Après quelques inversions, 600 µl de P/C/I sont ajoutés. Le microtube est ensuite inversé quelques fois et bien vortexé afin d'obtenir un mélange blanchâtre qui est incubé sur glace pendant 15 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé à 4°C pendant 20 minutes à 12000 rpm. Cette centrifugation permet d'obtenir 3 phases :

- la phase aqueuse supérieure contenant l'ARN ;
- la 'galette' blanche au centre, l'ADN génomique ;
- la phase organique inférieure contenant les protéines et débris cellulaires.

La phase supérieure est délicatement prélevée sans toucher la galette d'ADN et transférée dans un nouveau microtube. Un volume égal d'isopropanol est ajouté et le microtube est incubé à -20°C pendant minimum 30 minutes. Une deuxième centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 12000 rpm permet de culotter l'ARN. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol 75% refroidi à 4°C. Après une nouvelle centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 12000 rpm, le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'air libre. Une fois sec, l'ARN total est resuspendu dans 20 µl d'eau 'nuclease-free', et quantifié par lecture de la DO à 260 nm au spectrophotomètre (dilution 100 x).

5.2. Transcription Inverse

La transcription inverse consiste à générer des brins d'ADN complémentaires (ADNc) à partir d'ARN messagers (ARNm). Des amorces polyT s'hybridant sur les queues polyA des ARNm vont permettre à une transcriptase inverse de synthétiser 1 brin d'ADNc par ARNm.

1. Matériels

- Microtubes de 1.5 ml (Sarstedt)
- Oligo(dT)₍₁₂₋₁₈₎ Primer (0,5 µg/µl) (Invitrogen)
- Eau 'nuclease-free' (Promega)
- SuperScript II RNase H (200 U/µl) avec tampon RT 5X et DTT 0,1 M (Invitrogen)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl) (Promega)
- dNTP set (Eurogentec)
- Ribonuclease H (2 U/µl) (Invitrogen)
- Blocs chauffants à 37 °C, 42 °C et 70 °C (Techne Dri-Block)

2. Méthode

Un volume contenant 5 µg d'ARN est prélevé et ajusté à 7,5 µl avec de l'eau 'nuclease-free'. L'ajout de 2 µl d'amorces oligo(dT) permet d'obtenir un volume de 9,5 µl qui est incubé 10 minutes à 70°C afin de dénaturer l'ARN et permettre l'hybridation des amorces polyT aux queues polyA des ARNm. Les microtubes sont ensuite placés 5 minutes sur glace. Pendant ce temps, un mix contenant du tampon pour la transcription inverse, du DTT, des dNTP, de l'eau 'nuclease-free' et de la RNasin est préparé (tableau II.3). 9 µl de ce mix sont ajoutés par microtube et ceux-ci sont incubés 5 minutes à température ambiante avant d'ajouter 1,5 µl de SuperScript. On incube à 42°C pendant 1h30 afin que la réaction de transcription inverse se réalise. La Superscript est ensuite inactivée par une incubation de 15 minutes à 70°C. Afin d'éliminer les ARN toujours hybridés aux ADNc, 1 µl de RNase H est ajouté et les microtubes sont incubés à 37°C pendant 20 minutes. Les microtubes sont congelés immédiatement à -20°C.

5.3. PCR en temps réel

La PCR (Polymerase chain reaction) en temps réel est une technique basée sur la PCR classique et qui permet de mesurer et de visualiser l'amplification de l'ADN cycle par cycle

grâce à l'utilisation d'un fluorochrome, le SYBR Green. Celui-ci a la particularité de pouvoir s'intercaler dans le petit sillon de l'ADN double brin et d'émettre de la fluorescence à 520 nm (Figure II.2.). La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN de départ.

La PCR en temps réel repose aussi sur la notion de cycle seuil ou Ct (cycle treshold). Celui-ci peut être défini comme le cycle de PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue du bruit de fond. Ce Ct se trouve dans la phase exponentielle de la réaction d'amplification, ce qui permet de calculer la quantité d'ADNc au départ, sans influence de la limitation en amorces. Le cycle seuil est inversement proportionnel à la quantité de matériel au départ et donc, il sera d'autant plus faible que la quantité d'ADN au départ est élevée.

Le SYBR Green étant une sonde fluorescente s'intercalant entre tous les ADN double brin, une étape de dissociation est ajoutée à la suite de l'étape d'amplification afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Celle-ci consiste à augmenter la température progressivement jusqu'à 95°C de manière à ce que les amplicons se dissocient à leur température de melting, à laquelle une forte chute de fluorescence est observée. La dérivée de la courbe de la fluorescence en fonction de la température montre donc un pic unique à cette température. Les autres pics, à d'autres températures, visibles sur ce graphe sont dus à la dissociation soit de dimères d'amorces, soit d'ADN génomique contaminant.

1. Matériels

- Microtubes (Sarstedt)
- Plaque 96 puits (Applied Biosystems)
- Support de plaque 96 puits (Applied Biosystems)
- Eau milli Q (Millipore)
- Amorces (Applied Biosystems)
- SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems)
- Tips à filtres (Greiner bio-one)

2. Méthode

Les ADNc pour chaque condition sont dilués 100 x dans de l'eau milli Q et la courbe standard est réalisée par une dilution sériée de 10 en 10 à partir d'un pool d'ADNc. Les séquences des amorces utilisées, leurs concentrations finales, ainsi que leurs températures de melting sont reprises dans le tableau II.4. Un mix contenant du SYBR Green, des amorces sens, des amorces anti-sens et de l'eau est préparé et 20 µl sont placés dans chaque puits (tableau II.5). 5 µl d'ADNc dilué 100 x ou des dilutions sériées sont alors ajoutés dans chaque puits correspondant. Les puits blancs reçoivent, quant à eux, 5 µl d'eau milli Q. Chaque condition est réalisée en double.

Les puits sont ensuite fermés par un film plastique autocollant et la plaque 96 puits est centrifugée brièvement avant d'être placée dans l'ABI Prism 7900 HT. L'analyse des données et le traitement des résultats se font au moyen du programme SDS 2.1.2 (Sequence Detection System) d'Applied Biosystems.

6. PROTEOMIQUE

Les gels 2D constituent des outils d'études protéomiques, car ils permettent de séparer les protéines d'un extrait cellulaire selon leur point isoélectrique dans un premier temps, et selon leur poids moléculaire dans un second temps, de manière à ce qu'un spot du gel corresponde en principe à une seule protéine.

La réalisation de gels 2D se déroule en plusieurs étapes :

1. *La préparation des échantillons* : cette étape consiste à extraire les protéines de cellules mises en culture dans différentes conditions. L'élimination des sels lors de cette extraction est cruciale, car ceux-ci peuvent interférer avec l'électrophorèse. De la qualité de l'échantillon dépendra le pouvoir de résolution du gel.

2. *L'électrophorèse en IsoElectric Focusing (IEF)* : cette migration se réalise en condition non dénaturante et permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique.

3. *L'électrophorèse SDS – PAGE* : lors de cette étape, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire. Cette migration en 2^{ème} dimension se passe, dès lors, en condition dénaturante, en présence de SDS, dans un gel de polyacrylamide.

4. *La révélation* : les protéines ayant été séparées par gels 2D peuvent être révélées par différents moyens. Les trois types de révélation utilisées lors de ce mémoire sont :

- la coloration à l'argent : Cette coloration consiste à imprégner les protéines d'argent puis à faire précipiter celui-ci, révélant les protéines en des spots brunâtres. Cette coloration est très sensible et permet de détecter des quantités de protéines de l'ordre de 0,1 ng.

- le marquage aux fluorochromes : Pour cette révélation particulière, les échantillons protéiques sont marqués par des fluorochromes (cyanine) AVANT les électrophorèses. Les 3 conditions (contrôle, test et standard interne), marquées différemment, vont migrer dans un seul et même gel, qui va ensuite être scanné à différentes longueurs d'ondes afin d'identifier les spots spécifiques de chaque condition. Cette technique, appelée le 2D – DIGE (Difference In Gel Electrophoresis), permet donc d'éliminer les variations de gel à gel et de simplifier l'étape d'analyse des gels.

- le marquage au ruthénium : Ce marquage en fluorescence après migration des échantillons consiste à imprégner les protéines de ruthénium, et de scanner ensuite les gels à la longueur d'onde spécifique de ce fluorochrome. Les étapes de réalisation des gels sont identiques à celles effectuées pour une coloration à l'argent.

6.1. Préparation des échantillons

1. Matériels

- PBS (Tableau II.2.)
- Pipettes 10 ml (Sarstedt)
- Râteau de 30 cm (TPP)
- Microtubes de 1,5 ml (Sarstedt)
- Thiourée (Sigma)
- Urée (Pharmacia)
- Centrifugeuse à microtubes (Heraeus)
- CHAPS (Pharmacia)
- Tris (Merck)
- Mixer à microtubes (Eppendorf)
- Sonicateur (Branson)
- Cyanine 2, 3 et 5 (Amersham Biosciences)
- Lysine (Sigma)

2. Méthode

Les cellules, mises en culture dans des T75 et soumises à différents traitements, sont rincées deux fois au PBS avant d'être raclées dans 1 ml de celui-ci. Après centrifugation pendant 10 minutes à 1000 rpm, le PBS est entièrement décanté afin d'éliminer toute trace de sels. Le culot est alors resuspendu dans 70 µl de tampon de lyse (tableau II.6), placé sous agitation à température ambiante pendant minimum 20 minutes, et passé 10 minutes au sonicateur si une galette d'ADN visqueuse est observée. Le microtube est ensuite centrifugé 10 minutes à 13000 rpm, le surnageant est récupéré et congelé à -80°C.

Pour le marquage des protéines aux fluorochromes, un mix contenant 25 µg de protéines de chaque condition est préparé pour le standard interne. 50 µg de protéines de chaque condition sont également prélevés dans des microtubes. 3 µl de cyanine 2 sont ajoutés au mix servant de standard interne, 1 µl de cyanine 3 à deux conditions contrôle et une

condition test, et 1 µl de cyanine 5 à la dernière condition contrôle et aux deux autres conditions tests (tableau II.7). Les tubes sont ensuite mélangés et laissés sur glace 30 minutes à l'abri de la lumière. 1 µl de lysine est ajouté par condition et 3 µl pour le standard interne. Les tubes sont à nouveau mélangés et mis sur glace pendant 10 minutes, toujours à l'abri de la lumière. Les mélanges des différentes conditions pour la réalisation des 3 gels sont préparés (tableau II.7) et dilués 2 fois dans du tampon de lyse 2X (Tableau II.6). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les échantillons sont prêts à être chargés sur les gels 1D.

6.2. Electrophorèse en IEF

1. Matériels

- Urée (Pharmacia)
- Thiourée (Sigma)
- CHAPS (Pharmacia)
- Pince
- DTT (Amersham Biosciences)
- Eau milli RO (Millipore)
- Electrodes (Wicks-Biorad)
- IPGphor (Pharmacia Biotech)
- IPG (Immobilized pH gradient) (Amersham Biosciences)
- Paper wicks (Amersham Biosciences)
- Strip holder (Amersham Biosciences)
- Reswelling Tray (Amersham Biosciences)
- Gels 1D (Amersham Biosciences)
- Cover Fluid (Amersham Biosciences)
- Cupules (Amersham Biosciences)

2. Méthode

Du tampon de réhydratation (tableau II.8) auquel a été ajouté du DTT 2,8 % ainsi que des IPG correspondantes au gel 1D est placé dans les différentes rangées d'un Reswelling Tray (Figure II.3. 1.). Le gel 1D est alors placé sur le tampon de réhydratation. Après 15 minutes, le gel est recouvert de 'cover fluid' et est laissé à réhydrater toute une nuit. Le gel réhydraté est placé dans un 'strip holder', gel vers le haut. Deux 'paper wicks' par gels sont découpés, mouillés avec de l'eau milli RO et placés aux extrémités du gel. Les électrodes sont ensuite placées sur les 'paper wicks' et du 'cover fluid' est ajouté afin de couvrir tout le gel. La cupule de chargement est ensuite placée près de l'électrode positive et le 'strip holder' est déposé sur l'IPGphor (Figure II.3. 2.). Pour une coloration à l'argent, un volume contenant 90 µg de protéines est dilué 2 fois dans du tampon de réhydratation auquel on a rajouté du DTT 2% et des IPG 0,5 %. Ces 90 µg sont déposés dans la cupule de chargement. Pour le 2D-DIGE, les mélanges contenant les protéines marquées aux cyanines sont chargés entièrement dans la cupule. Le programme suivi par l'IPGphor est repris dans le tableau II.9.

6.3. Electrophorèse SDS-PAGE

1. Matériels

- Gel caster (Amersham Biosciences)
- Films plastiques
- Plaques de verre avec ou sans espaceurs
- Pincettes et scalpel
- Acrylamide (Biorad)
- Ettan Dalt II System (Amersham Pharmacia Biotech)
- Eau MilliQ (Millipore)
- SDS (Amersham Biosciences)
- APS (Amersham Biosciences)
- Agarose (Amersham Biosciences)
- Isobutanol (Merck)
- Pipettes Pasteur (Bilbate)
- Glycine (Amersham Biosciences)
- Urée (Pharmacia)
- Glycérol (Merck)
- DTT (Amersham Biosciences)
- IODOacétamide (Biorad)
- Tris (Merck)
- TEMED (Pharmacia)

2. Méthode

Les plaques de verre sont placées dans le 'gel caster' en alternant une plaque avec espaceurs, une plaque sans espaceurs et un film plastique. Le couvercle est ensuite placé sur le 'gel caster' et est fixé sur les côtés par des pinces. La solution de gel 2^{ème} dimension (tableau II.10) est préparée et coulée dans le 'gel caster' jusqu'au dessus des espaceurs. Environ 1 ml d'isobutanol est versé sur le dessus de chaque gel afin d'empêcher le contact avec l'oxygène et permettre la polymérisation. Les gels 1D sont rincés à l'eau distillée et puis placés dans la solution d'équilibration (tableau II.11) deux fois 15 minutes : les 15 premières où du DTT 1% a été rajouté à la solution d'équilibration et les 15 autres où c'est de l'IODOacétamide 2,5 % qui est rajouté. Une fois que les gels 2^{ème} dimension sont polymérisés, ils sont retirés du 'gel caster' et rincés à l'eau. Le gel 1D est trempé dans le tampon d'électrophorèse (tableau II.12) et est placé entre les deux plaques de verre à 0.5 cm du bord du gel 2D. Une solution d'agarose est alors versé entre les deux plaques de verre et le gel 1D est poussé tout de suite contre le gel 2D. Les plaques sont ensuite placées dans l'Ettan Dalt (Figure II.3. 3.) rempli de tampon d'électrophorèse. La migration s'effectue durant 17 h minimum.

6.4. Révélation

6.4.1. Coloration à l'argent

1. Matériels

- Ethanol (Merck)
- Acide acétique (Merck)
- Eau milliQ (Millipore)
- Na acétate.3H₂O (Merck)
- Na₂S₂O₃.5H₂O (Merck)
- Glutaraldéhyde (Fluka)
- Silver nitrate (AgNO₃) (Merck)
- Formaldéhyde (Sigma)
- Na₂CO₃ (VWR international PROLABO)
- EDTA (Merck)

2. Méthode

Après avoir été démoulés, les gels sont placés dans une solution de fixation (tableau II.13) pendant 30 minutes. La solution de fixation est ensuite éliminée et remplacée par la solution de sensibilisation (tableau II.14). Les gels sont laissés dans cette solution au minimum 1 heure. Après avoir été rincés 3 fois 10 minutes avec de l'eau distillée, les gels sont placés dans la solution 'Silver' (tableau II.15) pendant 30 minutes. Les gels sont de nouveau rincés à l'eau distillée pendant 2 fois 1 minute et puis sont placés dans la solution de 'Developing' (tableau II.16) pendant 1 à 5 minutes, jusqu'à ce que les spots soient bien visibles. La révélation des spots est arrêtée par l'incubation des gels dans la solution stop (tableau II.17). Les images sont acquises par scan des gels au moyen du programme Labscan.

6.4.2. Révélation et analyse en 2D-DIGE

1. Matériels

- Typhoon 9400 (Amersham Biosciences)
- Programme DeCyder 6 (Amersham Biosciences)
- Spot Picker (Amersham Biosciences)
- Spectromètre de masse (MALDI-TOF, LC MS/MS) (Waters)

2. Méthode

Une fois la migration en 2^{ème} dimension terminée, les gels sont rincés à l'eau milliQ et placés dans le scanner Typhoon (Figure II.3. 4.). Chaque gel est scanné à 3 longueurs d'ondes, chacune étant spécifique d'un fluorochrome (Cy 2, Cy 3 ou Cy 5). Une image par longueur d'onde est alors enregistrée. Les paramètres d'optimisation du scan sont réglés à l'aide du programme Typhoon Scanner Control. Les 3 gels scannés aux 3 longueurs d'ondes sont analysés par le programme DeCyder 6. Ce programme va tout d'abord dénombrer les spots pour chacun des 3 gels et définir un gel 'master' qui va servir de référence afin de normaliser les deux autres. La moyenne des 3 gels contrôles et la moyenne des 3 gels tests sont ensuite comparés spot par spot. Les spots présentant des variations d'expression significatives (test t de Student : $p \leq 0.05$) sont répertoriés dans une liste qui permet de sélectionner les protéines intéressantes à prélever. Les coordonnées de ces protéines sont envoyées au spot picker (Figure II.3. 5.) qui, d'après deux pastilles de référence, va extraire les protéines d'intérêt des gels et les placer dans 200 µl d'eau, dans une plaque multipuits. Ces protéines vont alors pouvoir être identifiées par spectrométrie de masse.

L'analyse par spectrométrie de masse des protéines digérées par la trypsine est effectuée sur un appareil MALDI-TOF ou LC-QTOF. Ce dernier est un tandem MS/MS qui permet d'obtenir de l'information sur la masse des peptides et la séquence, en un temps de traitement moyen d'une heure par échantillon. Ces appareils de grande précision et de haut rendement sont idéaux pour les échantillons tirés de gels 2D.

6.4.2. Marquage au Ruthénium

1. Matériels

- Ethanol (Merck)
- Acide acétique (Merck)
- Ruthénium (Ulg)

2. Méthode

Après avoir été démoulés, les gels sont fixés dans une solution contenant 30 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique pendant 6 h. Ils sont ensuite rincés 3 fois 30 minutes dans de l'éthanol 20 % avant d'être incubés toute une nuit dans une solution d'éthanol 20 % contenant du ruthénium à une concentration de 100 nM. Les gels sont équilibrés dans de l'eau pendant 2 fois 10 minutes et puis scannés au moyen du Typhoon 9400. L'analyse des gels se fait par le programme DeCyder 6, pareillement à l'analyse des gels réalisés en 2D-DIGE.

7. WESTERN BLOT

1. Matériels

- | | | |
|-------------------------------|--|---------------------------------|
| - Isobutanol (Merck) | - Pipettes Pasteur (Bilbate) | - Tween (Sigma-Aldrich) |
| - 'Loading' tips (Biozym) | - β-mercaptoéthanol (Fluka) | - HCl fumant (Merck) |
| - Glycérol 87 % (Merck) | - Seringue et aiguille courbe (Terumo) | - Acrylamide (Biorad) |
| - Bleu de bromophénol (Merck) | - Cassette de révélation | - Gloria (Nestlé) |
| - Pincettes | - Glycine (Merck) | - Solution de fixation (Ilford) |
| - Membrane (HyBond) | - Méthanol 100 % (Merck) | - Transparents (Stabilo) |
| - Films photo (Amersham) | - Papiers absorbants (Whatman) | - APS (Amersham) |
| - Vaseline (Vel) | - Solution de révélation 2000RT (Ilford) | - TEMED (Pharmacia) |

- SDS (Amersham)
- Éponges (Spontex)
- Tris (Merck)
- Étalon de poids moléculaire SeeBlue (InVitrogen)
- Bloc chauffant à 70°C (Techne Dri Block)
- Cuve de migration, peigne, plaques de verre, 'spacers' et éponges
- ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham) : solution A et B, et blocking agent (lait)
- Anticorps primaire dirigé contre la sous-unité régulatrice de la glutamate cystéine ligase (Ig polyclonal de lapin, Santa Cruz)
- Anticorps primaire dirigé contre l' α -tubuline (Ig G1 monoclonal de souris, Sigma)
- Anticorps secondaire couplé à la HRP et dirigé contre les Ig de lapin (ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody (âne), Amersham)
- Anticorps secondaire couplé à la HRP et dirigé contre les Ig de souris (ECL mouse IgG, HRP-linked whole antibody (mouton), Amersham)

2. Méthode

Le montage de la cuve d'électrophorèse se fait comme illustré à la figure II.4. 175 μ l d'APS 25 % et 10,5 μ l de TEMED sont ajoutés à 35 ml de 'gel mix' (Tableau II.18 et II.19). Le tout est bien mélangé et coulé entre les deux plaques de verre jusqu'à ce que le gel arrive un peu au-dessus du trait. On verse ensuite 1 ml d'isobutanol saturé par-dessus et on laisse polymériser pendant 1 heure. L'isobutanol est éliminé et le gel est rincé 3-4 fois à l'eau distillée. 50 μ l d'APS 25 % ainsi que 3 μ l de TEMED sont ajoutés au 'spacer gel mix' (Tableau II.20 et II.21) et ce mélange est coulé sur le gel séparateur. Le peigne est mis en place et on laisse polymériser ce gel concentrateur 45 minutes.

Les échantillons protéiques sont dilués afin d'obtenir 35 μ g de protéines dans 40 μ l. Après avoir ajouté 10 μ l de bleu de charge 5 X (Tableau II.22) à chaque échantillon, ceux-ci sont placés 10 minutes à 70°C. Lorsque le gel concentrateur est polymérisé, le peigne est retiré et les puits sont rincés avec du 'running buffer' (Tableau II.23). Le montage est placé dans la cuve d'électrophorèse, dans laquelle on ajoute 1 litre de 'running buffer', en éliminant les bulles d'air à l'aide d'une seringue dotée d'une aiguille courbe. Les échantillons et l'étalon de poids moléculaire sont ensuite chargés dans les puits au moyen de 'loading tips'. La migration s'effectue pendant 30 minutes à 35 mA dans le gel concentrateur, et environ 3 heures à 45 mA dans le gel séparateur.

La membrane est réhydratée 1 minute dans du méthanol 100 % et équilibrée pendant 5 minutes dans du 'blotting buffer' (Tableau II.24). Une fois que le front de migration a atteint le bas du gel, celui-ci est démoulé délicatement au moyen d'une spatule. Le gel concentrateur ainsi que les excès de gel séparateur sont éliminés. La membrane est ensuite déposée sur le gel, suivie d'un papier Whatman et d'une éponge Spontex humidifiés dans du 'blotting buffer'. Le tout est retourné et on replace alors un papier Whatman et une éponge humidifiés sur le gel (Figure II.6.). Ce montage est placé dans l'appareil de transfert, membrane du côté du pôle positif, c'est-à-dire vers le bas. Le transfert s'effectue pendant 2 heures à 150 mA.

La membrane est récupérée et placée pendant toute la nuit à 4 °C dans 30 ml de TBS-T (Tableau II.25 et II.26) + 2 % de lait Amersham ou 5 % Gloria. La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'Ac primaire dilué dans du TBS-T + lait. Après 3 lavages de 30 minutes avec 30 ml de TBS-T, la membrane est incubée 45 minutes à température ambiante avec l'Ac secondaire dilué dans du TBS-T + lait. Enfin, la membrane est lavée 3 fois 15 minutes avec 30 ml de TBS-T.

La membrane est déposée, protéines vers le bas, sur 1 ml de solution de révélation (= 500 μ l de solution A + 500 μ l de solution B) pendant 5 minutes. Elle est ensuite placée, protéines vers le haut, entre deux transparents fixés dans le coin supérieur droit d'une cassette de révélation préalablement nettoyée à l'alcool.

En chambre noire, un film photo est découpé et placé dans le coin supérieur droit de la cassette pendant un temps variable, dépendant de la protéine à révéler. Le film est ensuite placé dans la solution de révélation jusqu'à apparition des bandes, puis rincé brièvement à l'eau et transféré dans la solution de fixation pendant 3-4 minutes. Après avoir rincé le film abondamment à l'eau et l'avoir fait sécher, il est replacé dans le coin supérieur droit de la cassette afin de noter l'emplacement de l'étalon de poids moléculaire.

Le film est ensuite scanné (programme Labscan) et les bandes sont quantifiées au moyen du programme Image Master Total Lab.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets des LDL modifiées, sur l'expression génique au sein des macrophages murins RAW 264.7, par une approche protéomique de type 2D-DIGE. Vu la relative lourdeur et le coût de cette approche, nous avons d'abord voulu préciser les conditions de stimulation des cellules RAW 264.7 avec les LDL natives et modifiées (oxLDL et acLDL). Dans ce travail, seules les oxLDL seront utilisées pour l'analyse protéomique.

1. VALIDATION DES CONDITIONS DE STIMULATION DES MACROPHAGES RAW 264.7

1.1. Modèle cellulaire

Les cellules utilisées lors de ce mémoire sont les macrophages murins RAW 264.7. Ces macrophages sont transformés par le virus de la leucémie murine d'Abelson.

Ces cellules sont fréquemment utilisées comme modèle de macrophages dans le contexte de l'athérosclérose. Elles ont été utilisées pour montrer, par exemple, que les macrophages stimulés avec des LDL oxydées surexprimaient le gène *Gclm* (Bea *et al.*, 2003).

Ces cellules possèdent de nombreuses caractéristiques des macrophages humains, notamment en ce qui concerne leur comportement par rapport aux LDL. En effet, elles possèdent des récepteurs aux LDL qui sont surexprimés lorsque les cellules sont incubées dans un milieu déficient en lipoprotéines et sont capables de métaboliser des complexes dextran sulfate-LDL et des LDL acétylées de manière semblable aux macrophages péritonéaux murins et aux monocytes-macrophages humains (Via *et al.*, 1985). Elles possèdent, de plus, une morphologie très semblable aux macrophages humains (Figure III.1.).

Cette lignée cellulaire convient donc bien à l'étude des effets des LDL natives ou modifiées sur les macrophages. Cependant, il est toujours recommandé de valider les résultats obtenus *in vitro* sur une lignée cellulaire telle que les cellules RAW 264.7, sur des macrophages péritonéaux murins et/ou sur des macrophages humains.

1.2. Isolement, oxydation et dosage des LDL

Les LDL sont isolées à partir d'un pool de plasma humain de 160 ml fourni par le CHR de Namur selon le procédé décrit dans le chapitre 'Matériels et méthodes' (point 2.). Après la première centrifugation, nous récoltons 5 à 6 ml de lipoprotéines. La deuxième ultracentrifugation, qui sépare les différentes lipoprotéines, permet de récupérer environ 3 ml de LDL. La moitié du volume de cet échantillon de LDL est oxydée par du sulfate de cuivre alors que l'autre moitié est conservée et constitue donc un échantillon de LDL natives. Les LDL natives et oxydées sont conservées à 4 °C et utilisées dans les 3 semaines suivant leur isolement.

Le dosage des LDL se fait par un dosage de leur fraction protéique par la méthode de Bradford. Une courbe d'étalonnage est tout d'abord réalisée en portant en graphique la densité optique à 595 nm en fonction de la concentration en BSA (Figure III.2.). À partir de l'équation de la droite obtenue et de la densité optique mesurée pour différentes dilutions de l'échantillon de LDL, il est possible de calculer la concentration des LDL.

On effectue ensuite la moyenne des concentrations obtenues pour les différentes dilutions. Le dosage est réalisé en double et nous obtenons, par exemple, des concentrations de 5123 et de 5487 µg/ml. La concentration finale pour cet échantillon est donc estimée à 5300 µg/ml.

1.3. Mesure de l'oxydation des LDL

Cette mesure se fait par le test colorimétrique T-BARS. Celui-ci permet de mesurer, dans un échantillon, la concentration en malondialdéhyde (MDA), un produit d'oxydation des LDL.

Comme pour le dosage des LDL, le test T-BARS se base sur une droite d'étalonnage. Celle-ci est obtenue en portant en graphique la densité optique mesurée à 532 nm en fonction de la concentration en MDA (Figure III.3.). La densité optique est également mesurée pour différentes concentrations en LDL natives et oxydées. D'après la droite d'étalonnage et ces valeurs, nous pouvons calculer la concentration en MDA dans les échantillons de LDL natives et oxydées.

Nous obtenons des concentrations de 2,5 nanomoles de MDA pour 1 mg de protéines pour les échantillons de LDL natives, alors que les échantillons de LDL oxydées contiennent 12 nanomoles de MDA pour 1 mg de protéines. Signalons que ces valeurs sont plutôt faibles (3 à 4 fois) par rapport à celles décrites dans la littérature, mais les valeurs de T-BARS ne sont pas systématiquement données et les méthodes d'estimation des protéines diffèrent selon les auteurs. Il existe donc un facteur 6 entre les LDL natives et oxydées. Les échantillons de LDL acétylées contiennent légèrement plus de MDA que les LDL natives, à savoir 6,5 nanomoles de MDA par mg de protéines.

1.4. Etude de la cytotoxicité des LDL natives et modifiées sur les macrophages

Connaissant la concentration des préparations de LDL et ayant vérifié leur état natif ou oxydé, nous avons mesuré la cytotoxicité induite par celles-ci sur les macrophages.

Cette mesure de la survie cellulaire se fait par le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Celui-ci consiste à incuber les cellules en présence de MTT, qui va être clivé en formazan, de coloration mauve, si les cellules sont métaboliquement actives. La mesure de survie cellulaire se fait par mesure de la densité optique à 570 nm après 2 heures d'incubation avec du MTT.

Différentes concentrations et temps ont été testés pour les LDL natives, les LDL oxydées et les LDL acétylées.

Nous avons tout d'abord mesuré la cytotoxicité induite par les LDL natives à une concentration de 50 µg/ml et par les LDL modifiées à des concentrations croissantes de 50, 100 et 150 µg/ml après 15 h (Figure III.4.).

Nous remarquons que la mortalité induite par les LDL natives à une concentration de 50 µg/ml est assez faible. En effet, environ 80 % des cellules survivent à ce traitement par rapport aux cellules contrôles, incubées en présence de milieu seul. Pour les cellules incubées en présence de LDL oxydées, une concentration de 50 µg/ml provoque la mortalité de 30 % des cellules par rapport aux cellules contrôles. Par contre, à une concentration de 100 µg/ml, à peine 20 % des cellules survivent, et à 150 µg/ml, presque toutes les cellules sont mortes. Les LDL acétylées induisent moins de cytotoxicité que les LDL oxydées. En effet, à une concentration de 50 µg/ml, 83 % des cellules survivent par rapport aux cellules contrôles. La moindre cytotoxicité induite par les LDL acétylées par rapport aux LDL oxydées est cependant nettement plus visible à plus fortes concentrations. A une concentration de 100 µg/ml, les LDL acétylées n'induisent que 25 % de cytotoxicité, et à 150 µg/ml, plus de 65 % des cellules survivent par rapport aux cellules contrôles.

Les fortes concentrations, 100 et 150 µg/ml, en LDL oxydées induisant la mort de plus de 80 % des cellules, nous avons décidé, pour les expériences suivantes de travailler à une concentration de 50 µg/ml, que ce soit pour les LDL natives, oxydées ou acétylées.

Nous avons alors réalisé une cinétique de survie cellulaire après traitement des cellules avec 50 µg/ml de LDL natives, oxydées, et acétylées. La cytotoxicité a été mesurée après 6 h, 18 h et 24 h d'incubation avec les LDL (Figure III.5).

Par rapport aux cellules contrôles, aucune cytotoxicité n'est observée pour les cellules incubées en présence de LDL natives, que ce soit après 6 h, 18 h, ou 24 h. Pour les cellules incubées en présence de LDL oxydées, on observe une légère diminution de la survie cellulaire au cours du temps. Cependant, même après 24 heures d'incubation en présence de LDL oxydées, plus de 80 % des cellules survivent à cette concentration. Comme il a déjà été montré sur la figure III.4, les LDL acétylées n'induisent presque pas de cytotoxicité à une concentration de 50 µg/ml après 15 h d'incubation. Elles ne provoquent pas plus de mortalité cellulaire après 18 ou 24 h. En effet, tout comme pour les LDL oxydées, plus de 80 % des cellules survivent après 24 h d'incubation en présence de LDL acétylées à une concentration de 50 µg/ml par rapport aux cellules contrôles. Si on compare les résultats obtenus pour les figures III.4 et III.5, la cytotoxicité semble plus faible dans la figure III.5. Il s'agit d'expériences faites sur des lots de cellules et des préparations de LDL différents.

Comme plus de 80 % des cellules survivent après 24 heures d'incubation en présence de LDL natives ou modifiées à une concentration de 50 µg/ml, nous pouvons réaliser des stimulations à cette concentration pendant 24 heures.

1.5. Mesure de l'induction de gènes par les LDL oxydées par la PCR en temps réel

Avant de se lancer dans la protéomique, nous avons voulu vérifier que les LDL oxydées peuvent moduler l'expression génique dans le modèle des macrophages RAW 264.7. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les données de Bea *et al.* (2003) qui montrent que l'incubation de ces macrophages avec des LDL oxydées, induit la surexpression des deux sous-unités de la glutamate cystéine ligase (Gcl). Cette enzyme catalyse la première réaction de la synthèse du glutathion et est composée d'une sous-unité catalytique (Gclc) et d'une sous-unité régulatrice (Gclm). Bea et son équipe ont montré, par PCR en temps réel, que *Gclc* et *Gclm* étaient surexprimés, au niveau ARNm, après stimulation des macrophages avec des LDL oxydées à une concentration de 30 µg/ml. Ils observent une surexpression des deux sous-unités déjà après 4 heures de stimulation et un pic de surexpression à 6 heures. Ce pic de surexpression étant plus important pour *Gclm* (8 fois) que pour *Gclc* (4 fois), nous avons tenté de reproduire l'induction de *Gclm* après stimulation des macrophages avec les LDL oxydées au laboratoire.

Après avoir stimulé les cellules avec des LDL natives ou modifiées à différentes concentrations et pendant différents temps, nous avons extrait les ARN totaux et réalisé une transcription inverse sur ceux-ci conformément au protocole des points 5.1. et 5.2. des 'Matériels et méthodes'. Nous avons ensuite effectué une PCR en temps réel sur les ADN complémentaires obtenus, en utilisant des amorces spécifiques des gènes *Gclm* et *Tbp*.

1.5.1. Effet du temps d'incubation et des concentrations en LDL oxydées – Expériences préliminaires

Dans l'article de Bea *et al.* (2003), on observe une surexpression de *Gclm* déjà après 4 heures de stimulation à une concentration en LDL oxydées de 30 µg/ml. Nous avons décidé de tester des temps de stimulation de 4, 6 et 8 h avec des concentrations en LDL oxydées de 30, 60 et 90 µg/ml.

Tbp (TATA box binding protein) a été choisi comme gène de maintenance en vue de normaliser les valeurs obtenues pour le gène *Gclm*.

La courbe standard réalisée pour ces deux gènes, *Gclm* et *Tbp*, nous montre une efficacité de PCR (E) équivalente (Figure III.6.) : 77 % pour *Tbp* et 80 % pour *Gclm* ($E = (10^{(-1/\text{pente})} - 1) * 100$). Ces valeurs permettent de simplifier les calculs d'expression du gène *Gclm*, vu que la différence d'efficacité de PCR est inférieure à 3,3 %.

Les résultats obtenus pour les 3 concentrations et les 3 temps de stimulation testés sont repris dans la figure III.7. Nous n'observons une faible surexpression que pour 8 heures de stimulation, à une concentration de 90 µg/ml (1,3 fois).

Nous avons donc décidé de stimuler les macrophages aux LDL oxydées pendant 6, 8 ou 12 h avec des concentrations en LDL oxydées de 100, 150 ou 200 µg/ml.

Les résultats obtenus en PCR en temps réel sont repris dans la figure III.8. Les valeurs obtenues pour le gène *Gclm* ont été normalisées par rapport au gène *Tbp*.

Tout comme pour les conditions testées précédemment, on n'observe toujours pas de surexpression du gène *Gclm* après stimulation des macrophages aux LDL oxydées. Même de fortes concentrations en LDL oxydées et des temps de stimulation plus longs n'induisent pas la moindre surexpression de *Gclm*.

Comme nous avons testé des temps de stimulation entre 4 et 12 h et des concentrations en LDL oxydées de 30 à 200 µg/ml, sans observer aucune surexpression du gène *Gclm*, nous avons pensé que le problème venait peut-être des LDL et de leur oxydation.

Dans l'article de Bea *et al.* (2003), les LDL sont isolées à partir de plasma, en utilisant du BHT comme antioxydant. Nous isolions, par contre, les LDL à partir de sérum et avec de l'EDTA comme antioxydant. Bien que le sérum et le plasma conviennent pour l'obtention de LDL, les résultats obtenus avec des LDL isolées à partir de plasma peuvent être légèrement différents des résultats obtenus avec des LDL isolées à partir de sérum. Le plasma est préféré au sérum si les LDL isolées doivent être oxydées (Ordovas, 1998). Ayant pris connaissance de ces données, nous avons décidé d'extraire les LDL à partir de plasma, en utilisant du BHT, comme dans l'article de Bea *et al.* (2003). Nous avons aussi allongé la période d'oxydation des LDL (17 à 24 heures). Il se peut donc que la différence dans la méthode d'isolement et d'oxydation des LDL joue un rôle critique dans leur capacité d'induction du gène *Gclm*. Nous stimulons également nos cellules dans un milieu complet (10 % sérum). Nous avons donc décidé de diminuer la concentration en sérum.

1.5.2. Effet dose dépendant de la stimulation des macrophages avec des LDL oxydées

Les macrophages sont stimulés pendant 6 heures dans du milieu contenant 1 % de sérum inactivé par la chaleur, avec des LDL oxydées, isolées à partir de plasma - en utilisant du BHT - à des concentrations de 25, 50, 100, et 150 µg/ml.

Les résultats obtenus sont représentés à la figure III.9. Dans ces conditions, on remarque déjà une surexpression du gène *Gclm* de 2,4 fois à une concentration en oxLDL de

25 µg/ml. Cette surexpression augmente avec la concentration en oxLDL. En effet, on observe une surexpression de 4,5 fois, de 9,6 fois et de 14,2 fois à des concentrations en oxLDL de 50, 100 et 150 µg/ml, respectivement.

Nous avons donc réussi à reproduire l'expérience de Bea *et al.* (2003) qui montrait une surexpression du gène *Gclm* après stimulation des macrophages murins RAW 264.7 avec des LDL oxydées. De plus, nous avons montré que la surexpression du gène *Gclm* après 6 heures de stimulation est proportionnelle à la concentration en LDL oxydées.

Maintenant que nous connaissons les conditions permettant d'observer une surexpression du gène *Gclm* après stimulation des macrophages aux LDL oxydées, nous allons tester d'autres temps de stimulation. Les LDL seront utilisées à 50 µg/ml, concentration à laquelle la cytotoxicité est moindre et la différence d'expression de *Gclm* marquée.

1.5.3. Cinétique de stimulation des macrophages avec des LDL oxydées

Comme le montre la figure III.10, la stimulation des macrophages avec des LDL oxydées à une concentration de 50 µg/ml induit un pic d'expression du gène *Gclm* après 6 heures de stimulation. En effet, après seulement 4 heures de stimulation, ou après 8 heures de stimulation, l'expression du gène *Gclm* est moindre qu'après 6 heures de stimulation. Le gène *Gclm* est surexprimé 5,2 fois après 6 heures de stimulation. Cette valeur correspond bien avec la surexpression de 4,5 fois obtenue précédemment dans les mêmes conditions (Figure III.9).

1.5.4. Stimulation des macrophages avec des LDL natives ou modifiées

L'article de Bea *et al.* (2003) montre également que les LDL natives n'induisent pas la surexpression de *Gclm*. Nous avons donc stimulé les macrophages pendant 6 heures avec des LDL natives à une concentration de 50 µg/ml. De plus, nous avons également testé si les LDL acétylées étaient capables, à une concentration de 50 µg/ml, d'induire la surexpression de *Gclm* après 6 heures de stimulation.

Les résultats de l'expression du gène *Gclm*, obtenus par PCR en temps réel, après stimulation des macrophages pendant 6 heures avec des LDL natives ou modifiées à une concentration de 50 µg/ml, sont présentés à la figure III.11. Que ce soit les LDL natives ou les LDL acétylées, aucune de ces deux préparations n'induit une surexpression du gène *Gclm* comparable à celle obtenue avec les oxLDL. L'expression du gène *Gclm* après traitement des macrophages aux LDL natives n'est que 1,2 fois supérieure à l'expression des macrophages contrôles, non stimulés. Il en est de même pour les macrophages stimulés aux LDL acétylées.

Cette expérience a été reproduite une deuxième fois, avec des résultats similaires (résultats non montrés).

Au vu des résultats obtenus, on peut donc affirmer que l'induction du gène *Gclm* est spécifique aux LDL oxydées.

1.5.5. Discussion

Le glutathion (GSH) est l'anti-oxydant le plus abondant dans la cellule. Il joue un rôle critique dans les défenses cellulaires contre les électrophiles, les stress oxydatifs et les radicaux libres. Le glutathion est composé de 3 acides aminés, le glutamate, la cystéine, et la

glycine, qui s'assemblent par action séquentielle de la glutamate cystéine ligase (Gcl) et de la glutathion synthétase (GSH synthétase). En plus de son activité anti-oxydante, le glutathion joue un rôle important dans de nombreuses fonctions. Il intervient par exemple dans le transport des acides aminés à travers les membranes, dans la synthèse et la dégradation de protéines, dans la régulation de l'expression génique, ...

La concentration intracellulaire en glutathion, de 1 à 8 mM dans des conditions normales, est le reflet d'un équilibre dynamique entre le taux de synthèse du GSH et les taux de consommation et de perte par efflux du GSH. La Gcl est l'enzyme limitante de la synthèse du glutathion. La régulation de son expression et de son activité est critique pour le maintien de l'homéostasie du glutathion.

La glutamate cystéine ligase est une enzyme hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique (*Gclc*) et d'une sous-unité régulatrice (*Gclm*), encodées par des gènes différents. Les promoteurs de ces deux gènes contiennent des 'antioxydant response elements' (ARE) qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de la réponse cellulaire au stress oxydatif et interviennent dans l'induction des deux sous-unités de la Gcl dans différents types cellulaires (Dickinson *et al.*, 2004 ; Bea *et al.*, 2003 ; Erickson *et al.*, 2002 ; Solis *et al.*, 2002 ; Wasserman et Fahl, 1997).

Shen et Sevanian ont montré, en 2001, que la stimulation de macrophages murins J774 A.1 avec des LDL oxydées, provoquait une diminution rapide du glutathion intracellulaire suivie d'une augmentation compensatoire. Par contre, la stimulation avec des LDL natives n'avait aucun effet sur le taux de GSH intracellulaire. Une stimulation avec des LDL acétylées ne provoquait pas de diminution rapide de la concentration en GSH, mais une légère augmentation de la concentration en GSH intracellulaire, de l'ordre de 30 %. Les variations de la concentration en GSH sont donc spécifiquement dues aux LDL oxydées. De plus, ils ont montré que ces variations étaient proportionnelles à la concentration en LDL oxydées. La diminution rapide de glutathion après stimulation aux LDL oxydées, est due à sa consommation par les peroxydes lipidiques et par les aldéhydes issus de leur dégradation. Cette diminution de GSH va créer un environnement oxydant, provoquant l'induction de la *Gclc* et de la *Gclm*, notamment par les peroxydes lipidiques. La surexpression de *Gcl* va conduire à l'augmentation de la synthèse de GSH, celle-ci étant l'enzyme limitante dans cette biosynthèse.

Les mêmes expériences avaient été réalisées par Darley-Usmar et son équipe (1991) sur des monocytes humains THP-1 différenciés en macrophages. Ils avaient observé exactement les mêmes résultats, c'est-à-dire, des variations de GSH suite à une stimulation aux LDL oxydées. Les LDL natives et acétylées n'induisaient, quant à elles, aucune variation de GSH.

Bea et son équipe ont montré, en 2003, que la stimulation de macrophages murins RAW 264.7 avec des LDL oxydées induisait la surexpression, au niveau transcriptionnel, de *Gclc*, mais aussi de *Gclm*. Un pic d'abondance des ARN messager de ces deux gènes était observé après 6 h de stimulation aux LDL oxydées. Ils ont également montré que les LDL natives n'induisaient pas cette surexpression des deux sous-unités de Gcl. Des analyses de promoteurs ont permis de déterminer que les séquences 'antioxydant response element' (ARE) présentes dans les promoteurs de *Gclc* et de *Gclm* sont nécessaires à l'induction de ceux-ci par les LDL oxydées. En effet, une mutation dans la séquence ARE atténue l'induction de *Gclc* et *Gclm* par les LDL oxydées. Les facteurs de transcription impliqués dans cette induction sont Nrf1, Nrf2 et c-jun. Ceux-ci sont connus pour se lier aux séquences ARE et, par ce fait, influencer la transcription des gènes.

Nous avons reproduit les résultats de Bea *et al.* (2003), montrant une surexpression du gène *Gclm* après stimulation des macrophages murins RAW 264.7. De plus, nous avons

également pu vérifier que cette induction était spécifique aux oxLDL, les LDL natives et acétylées n'induisant aucune surexpression. Nous observons également un pic de surexpression du gène *Gclm* après 6 heures de stimulation des macrophages RAW 264.7 avec des LDL oxydées. Cependant, Bea et son équipe (2003) montraient une surexpression de l'ordre de 10 fois après stimulation des macrophages à une concentration de 30 µg/ml. Nous avons obtenu une surexpression comparable (de l'ordre de 5 fois) à une concentration en LDL oxydées de 50 µg/ml. Ces légères différences sont probablement imputables aux disparités liées aux LDL et à leur oxydation.

Tout comme dans l'article de Shen et Sevanian (2001), montrant que les variations de la concentration en glutathion étaient proportionnelles à la concentration en LDL oxydées, nous avons montré que la surexpression de *Gclm* était également proportionnelle à la concentration en LDL oxydées.

Nous savons donc maintenant que les LDL que nous avons isolées et oxydées sont capables d'induire l'expression de gènes, notamment de *Gclm*. Nous pouvons maintenant entamer une étude protéomique des effets des LDL oxydées sur les macrophages RAW 264.7 et tenter d'identifier les protéines dont l'expression est modifiée après stimulation aux LDL oxydées. Dans ces protéines d'intérêt, nous allons tenter de déterminer celles qui sont codées par des gènes contenant des ARE dans leur promoteur. Par ailleurs, les LDL oxydées régulent également de nombreux gènes PPAR α dépendants.

2. ETUDE DES VARIATIONS D'EXPRESSION GENIQUE DE MACROPHAGES STIMULES OU NON AVEC DES LDL OXYDEES PAR UNE APPROCHE PROTEOMIQUE

Comme déjà mentionné, dans ce travail, nous n'étudierons que les effets des oxLDL sur l'expression génique des cellules RAW 264.7, mais à terme, ce travail s'inscrit dans une étude plus large visant à comparer les effets des oxLDL (lipotoxicité et stress oxydatif) et des acLDL (lipotoxicité), par une approche protéomique, de type 2D-DIGE (en fluorescence).

Vu le coût des sondes fluorescentes, nous avons fait quelques gels préliminaires colorés à l'argent.

2.1. Expériences préliminaires - Gels bidimensionnels colorés à l'argent

Nous avons décidé, dans un premier temps, de stimuler les macrophages aux LDL oxydées, à une concentration de 50 µg/ml, une telle concentration induisant l'expression de *Gclm* au niveau transcriptionnel, tout en étant peu cytotoxique. En ce qui concerne le temps de stimulation, nous avons opté pour 6 heures, car parmi les protéines induites par les LDL oxydées, on trouve, entre autres, des cytokines, ... qui sont rapidement exprimées après la stimulation. Par peur de rater ces inductions rapides, nous avons donc choisi un temps de stimulation assez court.

Nous avons également fait le choix d'une gamme de pH très large pour la migration des échantillons en première dimension. Une gamme de pH allant de 3 à 11 permet de visualiser la majorité des protéines extraites et de nous faire une idée globale de la quantité et de la répartition globale de celles-ci.

De plus, étant donné que les macrophages stimulés aux LDL oxydées accumulent celles-ci, un 'clean-up' des échantillons protéiques a été réalisé afin de déterminer si les lipides interféraient avec la migration des protéines en première ou seconde dimension. Le 'clean-up' consiste à purifier les échantillons en protéines par centrifugations et lavages de culots.

La figure III.12. représente les gels bidimensionnels colorés à l'argent réalisés sur des extraits protéiques, ayant subi un 'clean-up' ou pas, et provenant de macrophages murins RAW 264.7 stimulés pendant 6 h avec des LDL oxydées à une concentration de 50 µg/ml.

Nous remarquons tout d'abord que les spots sont bien définis et qu'aucune traînée due à une précipitation des protéines ou à une interférence des lipides avec la migration n'est observée. Les seules traînées visibles se trouvent au niveau de la cupule de chargement en première dimension et sont dues au fait que 90 µg de protéines sont déposés à cet endroit en une fois. On trouve également des traînées au niveau des protéines basiques de haut poids moléculaire, qui ont tendance à précipiter lors de la migration.

En comparant ces deux gels obtenus à partir d'échantillons protéiques ayant subi un 'clean-up' réalisé pour éliminer les lipides pouvant interférer avec les migrations, ou pas, aucune différence flagrante, que ce soit dans la définition ou dans la répartition des spots n'est observée. Il ne semble donc pas nécessaire de réaliser un 'clean-up' des échantillons protéiques.

Des gels bidimensionnels colorés à l'argent ont été réalisés simultanément sur des échantillons protéiques contrôles, provenant de cellules n'ayant pas été stimulées aux LDL oxydées. En comparant le gel 'contrôle' avec le gel 'test', on ne remarque aucune différence flagrante (Figure III.13.). Néanmoins, énormément de protéines sont présentes sur les gels et il est dès lors difficile de faire correspondre les spots du gel 'contrôle' avec les spots du gel 'test'. De plus, ces gels étant colorés à l'argent, une différence observée pour un spot dans la condition 'test' par rapport à la condition 'contrôle' n'est pas nécessairement significative. En effet, le 'dynamic range' de la coloration à l'argent étant très faible, si un gel reste quelques secondes de plus dans la solution de révélation, des différences vont apparaître entre les deux conditions.

Maîtrisant la technique des gels 2D, nous avons donc décidé de passer aux gels 2D-DIGE en fluorescence, qui se prêtent mieux à une analyse quantitative. Cette approche permet, en effet, par l'utilisation d'un standard interne, de mettre en évidence des variations d'abondance de protéines, de manière significative, même pour des variations faibles (de l'ordre de ± 20 %).

Nous avons cependant décidé de restreindre la gamme de pH à 4-7, ce qui permet de limiter le nombre de protéines visualisées et de mieux séparer les protéines se situant dans cette gamme de pH.

2.2. Effets des LDL oxydées – Approche protéomique en gels 2D-DIGE

2.2.1. Macrophages RAW 264.7 stimulés pendant 6 heures

Afin de réaliser des gels en 2D-DIGE, nous avons extrait les protéines de trois cultures indépendantes par condition, c'est-à-dire :

- 3 cultures stimulées pendant 6 h avec des LDL oxydées à une concentration de 50 µg/ml ;
- 3 cultures stimulées pendant 6 h avec des LDL acétylées à une concentration de 50 µg/ml ;
- 3 cultures stimulées pendant 6 h avec des LDL natives à une concentration de 50 µg/ml ;
- 3 cultures non stimulées avec des LDL, constituant le contrôle des 3 autres conditions.

Dans le mémoire, nous nous focaliserons sur les effets des LDL oxydées sur les macrophages RAW 264.7. Nous avons donc prélevé 50 µg de protéines de chacune des cultures indépendantes des cellules stimulées aux LDL oxydées. 50 µg de protéines de chacune des conditions contrôles sont également prélevés. Ces échantillons 'contrôles' et

‘LDL oxydées’ sont marqués aux cyanines et les mélanges des échantillons protéiques à charger sur les 3 gels sont réalisés selon le tableau II.7. du chapitre ‘Matériels et méthodes’.

Après avoir fait migrer les échantillons en première dimension dans un gel avec un gradient de pH allant de 4 à 7, et en deuxième dimension, les gels sont scannés au moyen du scanner Typhoon 9400.

1. Résultats

Tout comme pour les gels bidimensionnels colorés à l’argent, les spots obtenus en 2D-DIGE sont très bien définis et peu de traînées sont observées excepté au niveau de la cupule de chargement en première dimension (Figure III.14.).

Les images obtenues après le scan des gels sont ensuite analysées par le programme DeCyder 6. Celui-ci nous permet de comparer une à une les intensités des spots obtenus dans la condition ‘contrôle’ par rapport aux intensités des spots obtenus dans la condition ‘LDL oxydées’ pour chacun des 3 gels, après avoir normalisé ceux-ci au moyen du standard interne. Le programme calcule alors les spots dont l’expression varie significativement entre la condition ‘contrôle’ et la condition ‘LDL oxydées’ dans les 3 gels.

Le programme a permis de pointer 2 spots dont l’abondance varie significativement après stimulation avec des LDL oxydées par rapport à des macrophages non stimulés (Figure III.15.). L’abondance de la protéine se trouvant dans le spot 1608 est augmentée de 2.22 fois dans la condition ‘LDL oxydées’ par rapport à la condition ‘contrôle’, alors que la seconde protéine, présente dans le spot 1042, diminue de 2.25 fois dans la condition ‘LDL oxydées’.

Ces deux protéines d’intérêt ont été prélevées au moyen du ‘spot picker’, mais étant présentes en très faibles quantités, elles n’ont pu être identifiées par spectrométrie de masse.

2. Discussion

Nous avons donc réalisé des gels bidimensionnels selon la technique du 2D-DIGE sur des extraits protéiques de macrophages murins stimulés ou non pendant 6 heures avec des LDL oxydées à une concentration de 50 µg/ml. L’analyse des gels obtenus n’a permis de trouver que deux protéines dont l’expression varie significativement après stimulation des macrophages aux LDL oxydées.

Des études en protéomique sur les variations d’expressions protéiques après stimulation de macrophages aux LDL oxydées ont déjà été réalisées. Par exemple, Yu *et al.* (2003) ont réalisé des gels colorés à l’argent sur des monocytes humains U937 différenciés en macrophages et stimulés aux LDL oxydées. Dans leur expérience, Yu et son équipe ont stimulé les macrophages avec des LDL oxydées à une concentration de 80 µg/ml pendant 48 heures et ont, après analyse des gels, repéré 37 protéines dont l’expression variait significativement. Parmi ces 37 spots, 8 étaient présents dans la condition ‘contrôle’ mais pas dans la condition ‘LDL oxydées’. Par contre, 11 d’entre eux étaient absents de la condition ‘contrôle’ mais bien présents dans la condition ‘LDL oxydées’. L’équipe de Fach (2004) a, quant à elle, travaillé sur les protéines sécrétées par des monocytes humains THP-1 différenciés en macrophages et stimulés pendant 48 heures soit avec des LDL oxydées, soit avec des LDL natives à une concentration de 100 µg/ml. Ils ont analysé 133 protéines se retrouvant dans le milieu extracellulaire des cellules stimulées et ont trouvé 59 protéines dont l’expression augmentait et 17 dont l’expression diminuait dans les cellules stimulées aux LDL oxydées par rapport aux cellules stimulées aux LDL natives.

Ces deux études, parmi d'autres, nous suggèrent qu'un temps de stimulation plus long semble plus adéquat, si l'on veut observer plus de variations d'expression génique au niveau protéiques après stimulation des macrophages aux LDL oxydées. Il est vrai également que les expériences réalisées en PCR en temps réel montrent que la surexpression maximale au niveau ARNm du gène *Gclm*, n'apparaît qu'après 6 heures de stimulation aux LDL oxydées. Un certain temps est encore nécessaire pour observer cette surexpression au niveau protéique. Dans les études de Yu et de Fach citées ci-dessus, les macrophages sont stimulés pendant 48 heures. Cependant, comme l'expression du gène *Gclm* diminue déjà après 8 heures de stimulation aux LDL oxydées, nous avons décidé de stimuler les macrophages pendant 24 heures, sans changer la concentration en LDL oxydées, ce qui nous semblait le meilleur compromis.

2.2.2. Macrophages RAW 264.7 stimulés pendant 24 heures

Comme pour l'expérience à 6 h, 3 cultures indépendantes de macrophages RAW 264.7 sont réalisées pour chaque condition, à savoir :

- 3 cultures indépendantes de macrophages stimulés avec des LDL oxydées à 50 µg/ml pendant 24 h ;
- 3 cultures indépendantes de macrophages stimulés avec des LDL acétylées à 50 µg/ml pendant 24 h ;
- 3 cultures indépendantes de macrophages stimulés avec des LDL natives à 50 µg/ml pendant 24 h ;
- 3 cultures indépendantes de macrophages non stimulés avec des LDL, servant de condition contrôle pour les macrophages stimulés aux LDL oxydées, acétylées, et natives.

Nous avons réalisé les extractions protéiques de chacune de ces conditions, mais seuls les échantillons protéiques des conditions 'contrôles' et des conditions 'LDL oxydées' ont été utilisés dans ce travail. Les autres échantillons protéiques ont été conservés à - 80 °C, pour des études ultérieures.

2.2.2.1. Gels analytiques

1. Résultats

Les échantillons protéiques 'contrôles' et 'LDL oxydées' sont marqués aux cyanines et ensuite mélangés conformément au tableau II.7. du chapitre 'Matériels et méthodes'. Les 3 échantillons contenant 150 µg de protéines sont chargés sur des gels 1^{ère} dimension avec un gradient de pH allant de 4 à 7. Après migration en 1^{ère} et 2^{ème} dimensions, les 3 gels sont scannés au moyen du scanner Typhoon 9400 aux 3 longueurs d'ondes spécifiques des cyanines. Ces gels sont de moins bonne qualité que les gels obtenus sur les extraits protéiques des macrophages stimulés pendant 6 h avec des LDL oxydées réalisés précédemment (Figure III.16.). En effet, nous pouvons remarquer des traînées dues à la précipitation de protéines lors des migrations au niveau des pH plus acides. Cependant, la majorité des spots des gels sont bien définis, et grâce à l'analyse des gels par le programme DeCyder 6, la majorité des protéines va pouvoir être analysée.

Les images des gels scannés sont analysées par le programme DeCyder 6. Celui-ci a repéré 20 protéines dont l'expression variait significativement entre la condition 'contrôle' et la condition 'LDL oxydées' (Figure III.17.). Le numéro des spots de ces protéines, la valeur du test t de Student et le facteur de variation d'abondance dans la condition 'LDL oxydées'

par rapport à la condition ‘contrôle’ sont repris dans le tableau III.1. On remarque que seulement 5 protéines diminuent après traitement des macrophages pendant 24 heures aux LDL oxydées à une concentration de 50 µg/ml. Parmi les 15 protéines dont l’expression est augmentée dans la condition ‘LDL oxydées’ par rapport à la condition ‘contrôle’, 7 sont plus abondantes de l’ordre de 2 fois ou plus.

Ces 20 spots ont été prélevés au moyen du ‘spot picker’. Cependant, cette technologie ayant été introduite très récemment dans notre laboratoire, nous avons rencontré des problèmes techniques lors du prélèvement des spots d’intérêt. Ceux-ci n’ont pu être correctement récupérés que dans un seul des 3 gels.

2. Discussion

Après avoir testé un temps de stimulation de 6 heures pour lequel nous n’avons pas observé de grandes différences dans le pattern d’expression protéique, nous avons décidé de stimuler les macrophages RAW 264.7 avec des LDL oxydées, toujours à une concentration de 50 µg/ml, mais pendant 24 heures. Cette condition nous a permis de repérer, par 2D-DIGE, 20 protéines dont l’abondance variait significativement entre la condition ‘LDL oxydées’ et la condition ‘contrôle’. Parmi ces 20 protéines, seules 5 montrent une diminution d’abondance et parmi les 15 autres, 5 montrent une augmentation d’abondance supérieure à 2 fois.

Logiquement, nous devrions retrouver, parmi les 15 protéines montrant une augmentation d’abondance après stimulation des macrophages aux LDL oxydées, la sous-unité régulatrice de la glutamate cystéine ligase. Cette protéine a un poids moléculaire de 31 kDa et un point isoélectrique d’environ 5.1. Nous supposons donc, au vu de ces données, que les spots 1610 ou 1684 pourraient correspondre à la Gclm. Nous reviendrons sur ce point.

Certaines protéines d’intérêt n’étant présentes qu’en faible quantité et n’ayant réussi à prélever les spots contenant ces protéines que dans un seul gel, nous avons décidé d’attendre avant de tenter d’identifier ces protéines par spectrométrie de masse. En effet, comme nous ne chargeons que 150 µg de protéines par gel en 2D-DIGE, nous craignons de ne pas pouvoir identifier certaines protéines d’intérêt par manque de matériel. Afin de remédier à cette éventualité, nous avons décidé de réaliser un gel préparatif coloré au ruthénium sur lequel 300 µg de protéines extraites des cellules stimulées ou non aux LDL oxydées pendant 24 heures sont chargés. Les spots d’intérêt repérés par comparaison entre ce gel et un gel réalisé en 2D-DIGE seront prélevés à partir du gel préparatif et ajoutés aux spots correspondants déjà prélevés sur le gel réalisé en 2D-DIGE.

2.2.2.2. Gel préparatif

Ce gel préparatif ne sert qu’au prélèvement des spots d’intérêt repérés par 2D-DIGE. La coloration au ruthénium est, comme les cyanines, un marquage en fluorescence mais contrairement à celles-ci qui ne marquent que 2 à 3 % de la totalité d’une protéine, le ruthénium en marque 100 %, post-migration.

1. Résultats

Pour la réalisation de ce gel, 300 µg de protéines d’un mélange de la condition ‘contrôle 24 h’ et de la condition ‘LDL oxydées 24 h’ est chargé en deux fois sur un gel 1^{ère} dimension de pH 4-7. Après migration en première et seconde dimensions, le gel est coloré au ruthénium et scanné à la longueur d’onde spécifique de cette coloration (Figure III.18.). Il est logique d’observer des traînées horizontales correspondant à des précipitations lors de la migration en première dimension vu la quantité de protéines chargées (300 µg). L’image

obtenue est comparée, grâce au programme Decyder 6, à l'image d'un gel obtenu en 2D-DIGE sur lequel les protéines d'intérêt avaient été repérées. Sur les 20 spots d'intérêt repérés en 2D-DIGE, 17 ont pu être retrouvés sur le gel au ruthénium (Figure III.19.). Ces 17 spots ont donc été prélevés à l'aide du 'spot picker' et chacun d'entre eux a été ajouté au spot correspondant déjà prélevé sur le gel en 2D-DIGE.

Maintenant que nous possédons une plus grande quantité de protéines pour presque tous les spots d'intérêts, nous allons tenter d'identifier les protéines présentes dans ces spots par spectrométrie de masse. Le marquage aux cyanines a comme avantage que seulement 2 à 3 % de la totalité d'une protéine est marquée, ce qui laisse la majorité de la protéine non modifiée et facilement analysable par spectrométrie de masse. Le choix d'une coloration au ruthénium pour le gel préparatif, plutôt qu'une coloration à l'argent se justifie également par la plus grande facilité de traitement des échantillons pour la spectrométrie de masse, ainsi que par les meilleurs résultats obtenus avec cette coloration lors de l'identification des protéines.

Afin d'identifier la ou les protéines présentes dans chaque spot d'intérêt, celles-ci sont clivées par la trypsine et les peptides générés sont séparés par une chromatographie en phase liquide. Au fur et à mesure qu'ils sont élués de la colonne de chromatographie, les peptides sont ionisés et leur masse est calculée par un spectromètre de masse de type ESI-TOF. Les masses des peptides obtenues permettent, par comparaison avec les banques de données, d'identifier la ou les protéines composant le spot d'intérêt.

Nous avons réussi à identifier les protéines présentes dans 14 spots. Celles-ci sont répertoriées dans le tableau III.2. On peut remarquer que 9 spots contiennent une seule protéine. De plus, parmi elles, nous retrouvons la sous-unité régulatrice de la glutamate cystéine ligase, seule protéine retrouvée dans le spot 1684.

2. Discussion

La réalisation d'un gel préparatif, contenant 300 µg de protéines et coloré au ruthénium, nous a permis de prélever une plus grande quantité de protéines d'intérêt, et d'identifier les protéines correspondant à 14 spots. Malgré la gamme de pH assez étroite (4-7) en première dimension, 5 spots correspondent à plusieurs protéines.

Bien qu'il faille confirmer ces résultats, surtout lorsque plusieurs protéines se trouvent dans le même spot, nous allons passer en revue les différentes protéines identifiées par spectrométrie de masse dans les 14 spots.

SPOT 1684 (+ 2.87x) : Glutamate cysteine ligase modifier subunit

Nous avons montré, par PCR en temps réel, que le gène *Gclm* était fortement surexprimé après 6 heures de stimulation des macrophages avec des LDL oxydées. Nous sommes parvenus à montrer que la protéine codée par ce gène est également plus abondante après stimulation des macrophages aux LDL oxydées pendant 24 heures. De plus, *Gclm* est la protéine présentant la plus forte augmentation d'expression, celle-ci est, en effet, 2.87 fois plus abondante dans la condition 'LDL oxydées' par rapport à la condition 'contrôle'. Ce résultat permet de confirmer celui obtenu par PCR en temps réel sur le gène *Gclm*.

De plus, *Gclm* est la seule protéine présente dans ce spot et aucun doute n'est possible quant à son identification par spectrométrie de masse.

Comme nous l'avons déjà signalé, *Gclm* s'associe avec *Gclc* (Glutamate cysteine ligase catalytic subunit) pour former la glutamate cystéine ligase, enzyme limitante de la synthèse du glutathion. Ce dernier est l'antioxydant le plus abondant de la cellule et contribue à la détoxification des peroxydes lipidiques, des radicaux libres, Il n'est donc pas surprenant d'observer une augmentation de *Gclm* après stimulation des macrophages aux

LDL oxydées. Cette surexpression induit une augmentation de la synthèse du glutathion qui pourrait protéger le macrophage contre le stress oxydatif causé par les LDL oxydées et leurs produits d'oxydation tels que les peroxydes lipidiques.

SPOT 962 (+ 1.67x) : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6pd) constitue la seule protéine du spot 962. Son expression est augmentée de 1.67 fois dans la condition 'LDL oxydées' par rapport à la condition 'contrôle'.

La G6pd est l'enzyme limitante de la voie des pentoses phosphate. Cette voie permet de fournir des sucres à 3, 4, 5, 6 ou 7 atomes de carbones, ainsi que du ribose-5-phosphate intervenant dans la synthèse des acides nucléiques. De plus, cette voie génère du NADPH qui permet notamment de maintenir le glutathion sous sa forme réduite (GSH).

L'augmentation d'expression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase permet donc de générer une plus grande quantité de NADPH via la voie des pentoses phosphate. Ce NADPH pourra ensuite servir à maintenir le glutathion sous sa forme réduite et donc contribuer à la défense cellulaire contre les stress oxydatifs induits notamment par les LDL oxydées. Jain et son équipe (2004) ont d'ailleurs démontré que la G6pd était une enzyme anti-oxydante essentielle, requise pour le maintien du niveau cellulaire en glutathion et pour la protection contre des dysfonctionnements cardiaques induits par un stress oxydatif durant une ischémie –reperfusion.

SPOT 1522 (+ 2.45x) : Esterase D formylglutathione hydrolase

Cette protéine augmente de 2.45 fois dans la condition 'LDL oxydées' par rapport à la condition 'contrôle'. Bien que cette augmentation d'expression semble intéressante, peu d'informations sont disponibles concernant cette protéine. Elle semble jouer un rôle dans la voie de détoxification des formaldéhydes.

SPOT 1657 (+ 1.97x) : Carbonyl reductase 3

L'expression de cette protéine est augmentée de 1.97 fois lorsque les macrophages sont stimulés aux LDL oxydées, par rapport aux macrophages non stimulés.

La carbonyl réductase 3 appartient à la famille des aldo-kéto-réductases, et servirait à la détoxification des composés carbonyl produits par un stress oxydatif.

SPOT 427 (+ 1.59x) : Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator

Cette protéine, aussi appelée aminopeptidase regulator of TNF-R1 shedding (Arts-1), se lie au récepteur du 'tumor necrosis factor (TNF)' de type 1 et provoque le clivage de celui-ci. Ce clivage protéolytique du récepteur 1 du TNF génère des récepteurs solubles qui régulent la bioactivité du TNF.

SPOT 1618 (+ 1.6x) : Replication protein A2 30 kDa

La replication protein A2 (RpA2) est une sous-unité de la replication protein A (RpA). Cette dernière est une protéine de liaison à l'ADN simple brin et est essentielle pour de multiples processus du métabolisme de l'ADN, comme la réplication, la recombinaison et les mécanismes de réparation. RpA se lie avec une grande affinité à l'ADN simple brin et interagit spécifiquement avec de nombreuses protéines. Binz *et al.* (2004) ont montré que des

dommages à l'ADN provoquent une hyper-phosphorylation de RpA, ce qui diminue son activité dans la réplication de l'ADN, mais n'affecte pas sa capacité de réparation de l'ADN. Ce mécanisme de phosphorylation de RpA contribue donc au métabolisme de l'ADN et permet la réparation de l'ADN avant sa réplication. L'augmentation de la RpA après stimulation des macrophages aux LDL oxydées pourrait s'expliquer par des dommages causés à l'ADN par les radicaux libres générés par les LDL oxydées. Cette augmentation d'expression, couplée à la phosphorylation de RpA, permettrait de réparer les dommages causés à l'ADN par les radicaux libres avant sa réplication.

SPOT 714 (- 1.62x) : Lymphocyte cytosolic protein 2

Bien que cette protéine se retrouve seule dans ce spot et que son identification par spectrométrie de masse ne fait aucun doute, très peu d'informations pertinentes sont disponibles dans la littérature concernant cette protéine. Son expression diminue de 1.6 fois après stimulation des macrophages avec des LDL oxydées.

SPOT 835 (+ 1.99x) : Lymphocyte cytosolic protein 2

Cette protéine est aussi rencontrée dans le spot 714. Cependant, dans celui-ci, elle montrait une diminution d'expression de 1.6 fois après stimulation des macrophages avec des LDL oxydées, alors que dans ce spot, son expression est augmentée de 2 fois. La lymphocyte cytosolic protein 2 n'est donc pas une protéine qui sera prioritairement étudiée.

**SPOT 1482 (+ 2.72x) : Aldo keto reductase family 1 member E1
Peroxiredoxine 4**

Ce spot présente une augmentation d'expression de 2.72 fois dans la condition 'LDL oxydées' par rapport à la condition 'contrôle'. Cependant, comme 2 protéines ont été identifiées pour ce même spot, on ne sait pas dire quelle est la protéine dont l'expression varie après stimulation des macrophages aux LDL oxydées.

Les aldo-kéto réductases (AKR) sont une des trois superfamilles d'enzymes qui réalisent des réactions d'oxydo-réduction sur une grande variété de substrats endogènes ou exogènes, en utilisant le NAD(P)H comme cofacteur. Cette superfamille comprend 114 protéines exprimées chez les procaryotes et les eucaryotes et qui sont réparties dans 14 familles (AKR1-AKR14). La famille 1 (AKR 1) contient les aldose réductases, les aldéhyde reductases, les hydroxystéroïdes déshydrogenases, et les stéroïdes 5 β -réductases, et est la plus vaste. Comme deux protéines se retrouvent dans ce spot, il n'est pas possible de déterminer laquelle des deux est surexprimée de 2.76 fois après stimulation des macrophages aux LDL oxydées. Cependant, une augmentation d'expression d'aldo-kéto réductase pourrait constituer une réponse au stress car cette enzyme permettrait de réduire les aldoses, les aldéhydes, ... oxydés par les produits d'oxydation des LDL.

La peroxirédoxine 4 fait partie de la famille des peroxirédoxines (Prx). Cette famille de protéines anti-oxydantes comprend 6 membres chez les mammifères. Ces protéines sont des peroxidases qui utilisent la thiorédoxine et/ou le glutathion comme donneur d'électron. Elles se trouvent dans le cytosol, les mitochondries, les peroxisomes et le plasma, tous des sites potentiels de production de ROS. En plus de leur rôle de peroxidase, les Prx possèdent de nombreuses fonctions. Elles interviennent dans la détoxification des oxydants, la prolifération et la différenciation cellulaire et l'expression de gènes (Fujii et Ikeda, 2002). Shen et Nathan (2002) ont montré que la suppression d'une seule Prx provoquait les mêmes effets qu'une délétion du glutathion. Ils ont également montré que les Prx agissent

mutuellement et de manière non redondante et parfois de façon dépendante du stress pour protéger les cellules de blessures causées par les oxydants. Wong et son équipe (2000) ont, quant à eux, montré que la surexpression intracellulaire de la peroxiredoxine 4 murine empêchait la production de ROS induite par l'epidermal growth factor (EGF) ou par p53. Ils en ont conclu que la peroxiredoxine 4 murine était impliquée dans le 'signaling' d'oxydo-réduction intracellulaire. Enfin, toujours en 2000, l'équipe de Okado-Matsumoto a montré que la peroxiredoxine 4 était une protéine sécrétée qui pouvait exercer sa fonction de protection contre les dommages causés par les oxydants en restreignant l'action des ROS dans l'espace extracellulaire. Signalons que Ishii *et al.* (2004), utilisant des macrophages murins péritonéaux, montrent que des oxLDL augmentent l'expression d'une autre peroxiredoxine, la peroxiredoxine 1.

SPOT 1499 (+ 2.11x) : Acidic ribosomal phosphoprotein P0
Transaldolase 1
Glycéraldéhyde-3-phosphate dehydrogenase

Ce spot montre une augmentation d'expression de 2.1 fois dans la condition 'LDL oxydées' par rapport à la condition 'contrôle'.

L' 'acidic ribosomal phosphoprotein P0' forme un complexe avec les phosphoprotéines P1 et P2, et constitue une partie du ribosome eucaryote (Remacha *et al.*, 1995). Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la phosphorylation des protéines acides du ribosome par ces protéines est un mécanisme important de régulation du nombre de ribosomes actifs (Szyszka, 1999).

La transaldolase 1 est une enzyme impliquée dans la dernière réaction du cycle des pentoses phosphate. L'augmentation de son expression pourrait donc avoir les mêmes conséquences que l'augmentation d'expression de la G6pd, à savoir, une augmentation de la génération de NADPH, permettant de maintenir un taux de glutathion réduit et donc de lutter contre les radicaux libres, ... produit par un stress oxydatif. Mais de manière surprenante, on retrouve cette protéine dans d'autres spots (1445, 1448, 1454).

La glycéraldéhyde-3-phosphate dehydrogénase (Gapdh) est une enzyme intervenant dans la glycolyse. Le gène encodant cette protéine est souvent utilisé comme gène de maintenance, car généralement, son expression reste très stable. Cependant, elle varie en hypoxie (travaux de C. Michiels). De plus, Xiao *et al.* (2003) ont montré, par une approche protéomique, que des macrophages murins RAW 264.7 traités avec des particules obtenues à partir de gaz d'échappement diesel, surexpriment la glycéraldéhyde-3-phosphate dehydrogénase. D'après ces auteurs, ce type de particules engendre un stress oxydatif. Un Western Blot permettrait facilement de vérifier un changement d'abondance éventuel.

SPOT 1448 (+ 1.68x) : Transaldolase 1
Translocase of inner mitochondrial membrane 50
LIM and SH3 protein 1 = Lasp-1

La fonction et le rôle de la transaldolase 1 a déjà été expliqué pour le spot 1499. Il est surprenant de retrouver la même protéine dans deux spots distincts, même si ceux-ci sont proches l'un de l'autre. La présence de la transaldolase 1 dans ce spot serait plus probablement due à une contamination au niveau du spectromètre de masse. Notons qu'on la retrouve également dans le spot 1445 et 1454.

La 'translocase of the inner mitochondrial membrane 50' (Tim 50) est une protéine de la membrane mitochondriale interne impliquée dans le transport des protéines dans la mitochondrie. Guo et son équipe (2004) ont montré que la perte de Tim 50 chez les vertébrés

cause la perméabilisation de la membrane mitochondriale suivie de la libération du cytochrome c dans le cytoplasme parmi d'autres inducteurs mitochondriaux de la mort cellulaire. Cependant, aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant un rôle probable de Tim 50 dans les mécanismes de défenses anti-oxydantes ou dans les mécanismes de développement de l'athérosclérose. Par contre, le dysfonctionnement mitochondrial, induit entre autres par l'excédant de cholestérol et de oxLDL, pourrait jouer un rôle dans l'initiation des maladies cardio-vasculaires (Ballinger, 2005).

Lasp-1 est une protéine de liaison à l'actine qui joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette. Elle est nécessaire à la migration et à la survie cellulaire en réponse aux facteurs de croissance et aux protéines de la matrice extracellulaire.

SPOT 1261 (+ 1.79x) : Cathepsine D
Bisphosphate 3 nucleotidase
poly(rC) binding protein 2 (mCbp)

L'expression d'une de ces trois protéines est augmentée de 1.8 fois après stimulation des macrophages aux LDL oxydées.

La cathepsine D est une aspartate-protéase lysosomale qui intervient dans la dégradation lysosomique des protéines. Chen *et al.* (2002) ont montré par immunocytochimie que la cathepsine B, et probablement d'autres protéases, étaient plus abondantes dans les lésions athérosclérotiques. En 2003, Hakala *et al.* ont montré que la sécrétion d'enzymes lysosomales des macrophages peut induire la modification hydrolytique des LDL et la formation de cellules spumeuses dans l'intima. Par après, Li et Yuan (2004) ont montré que les lipides oxydés étaient capables d'induire la déstabilisation des lysosomes, menant à la libération dans le cytosol d'enzymes lysosomales comme la cathepsine D. De plus, ils ont montré que l'ARN messager de la cathepsine D était considérablement augmenté après stimulation des macrophages avec du 7beta-hydroxycholestérol, une forme oxydée du cholestérol. Les résultats obtenus par Li et Yuan suggèrent que l'endocytose de LDL oxydées par les macrophages déstabilise la membrane des lysosomes, provoquant la libération des enzymes lysosomales dans le cytosol, mais induit aussi la surexpression de cathepsines lysosomales, qui peuvent jouer le rôle d'enzyme de clivage durant le processus apoptotique des macrophages. L'augmentation du nombre de macrophages en apoptose, ainsi que la dégradation de la matrice extracellulaire par les enzymes lysosomales peut jouer un rôle important dans le développement et la rupture de la plaque d'athérome.

La bisphosphate 3 nucléotidase est une des enzymes impliquées dans la conversion du 3'-phosphoadénosine 5'-phosphate (PAP) en adénosine 5'-phosphate. Les enzymes composant cette voie sont essentielles, car le PAP est toxique pour de nombreux systèmes cellulaires.

La traduction de nombreux ARN messager eucaryotiques se fait par les sites IRES (internal ribosomal entry sites). La 'poly(rC) binding protein 2 (mCbp)' est une protéine qui permet d'augmenter la traduction par l'activation des sites IRES.

SPOT 1445 (+ 1.51x) : Farnesyl diphosphate synthetase
Transaldolase 1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2 beta
Protein phosphatase 1 catalytic subunit beta

Ce spot présente une abondance supérieure de 1.5 fois après stimulation des macrophages aux LDL oxydées. Il correspond aux 4 protéines suivantes.

La farnesyl diphosphate synthétase (Fpps) est une enzyme catalysant la formation de farnesyl diphosphate. Celui-ci est utilisé dans la synthèse de cholestérol, de protéines

possédant une ancre farnesyl ou géranyl-géranyl, de coenzyme Q, ... Krisans *et al.* ont montré, en 1994, que la Fpps est localisée principalement dans les peroxyosomes, et que ces organites sont, dès lors, les sites majeurs de synthèse de farnesyl diphosphate à partir de mévalonate. Cette étude a été confirmée deux ans plus tard par l'équipe de Biardi (1996). Il est connu que le gène codant Fpps est régulé par des protéines de liaison au 'sterol regulatory element (SRE)' (Le Jossic-Corcus *et al.*, 2004).

La transaldolase 1 se retrouve aussi dans ce spot mais plus que probablement suite à une contamination (voir spots 1448, 1499 et 1454).

L' 'eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3)' est un complexe composé d'au minimum 12 sous-unités dont la sous-unité 2 beta. Le facteur d'initiation de la traduction eIF3 se lie à la sous-unité 40S du ribosome, permet la liaison de méthionine-ARNt et d'ARNm, et interagit avec de nombreux autres facteurs d'initiation pour former le complexe d'initiation de la traduction 40S (Mayeur *et al.*, 2003).

La protéine phosphatase 1 (Pp1) est une sérine/thréonine phosphatase eucaryote qui régule de nombreuses fonctions cellulaires par interaction de sa sous-unité catalytique avec plus de 50 sous-unités régulatrices (Cohen, 2002). Les sérine/thréonine phosphatases sont des protéines possédant une cystéine dans leur site catalytique, et sont, dès lors, sujettes à l'oxydation.

SPOT 1454 (+ 1.54x) : Transaldolase 1

Nous retrouvons une fois de plus la transaldolase 1. Cependant, contrairement aux deux autres fois précédentes, elle est la seule protéine présente dans ce spot. Son expression est augmentée de 1.54 fois dans la condition 'LDL oxydées' par rapport à la condition 'contrôle'.

Parmi les protéines identifiées, nous avons recherché si certaines d'entre elles étaient codées par des gènes présentant des sites ARE dans leur promoteur. Rappelons que ces sites sont reconnus principalement par le facteur de transcription Nrf-2.

Thimmulappa *et al.* (2002) ont déterminé, en utilisant des souris knock-out pour Nrf-2 (Nrf-2 -/-) et par analyse sur damiers à ADN, toute une série de gènes régulés par Nrf-2. Parmi ceux-ci, on retrouve évidemment *Gclm* mais aussi les gènes codant la G6pd, la carbonyle réductase, la transaldolase et l'aldo-kéto réductase. Ces enzymes impliquées dans la détoxification d'électrophiles et de radicaux libres, ou dans la génération de NADPH sont donc régulées via un ou plusieurs sites 'ARE'. Par ailleurs, Nishinaka et Yabe-Nishimura (2005) ont montré sur des cellules HepG2, que la bêta-naphtoflavone, un activateur du facteur transcriptionnel Nrf-2, augmentait l'expression du gène AKR1 B3, un membre de la superfamille des aldo-kéto réductases.

Pratiquement, la recherche des sites de liaison à l'ADN pour Nrf-2 a été effectuée au moyen du programme en ligne TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Ce programme recherche les séquences consensus de liaison à l'ADN de facteurs de transcription, au sein de séquences promotrices des gènes d'intérêt. Les paramètres par défaut ont été gardés (matrice chez les vertébrés avec un seuil de certitude fixé à 85%). Plusieurs sites de liaison pour Nrf-2 ont été trouvés dans le promoteur du gène codant pour Tim 50. Cette protéine se retrouve dans un spot avec deux autres. Il faut donc vérifier si Tim 50 est bien surexprimée. Malheureusement, il n'existe pas, à notre connaissance, d'anticorps commercial contre Tim 50. Toutefois, on pourrait vérifier si le gène est bien surexprimé au niveau ARNm, par PCR en temps réel. Si cette surexpression se confirmait, cela vaudrait la peine de s'y intéresser de manière plus approfondie. En effet, Tim 50 est un composant du translocon de la membrane mitochondriale interne, qui a été récemment décrit

chez l'homme et qui joue un rôle important dans l'intégrité mitochondriale et la protection contre l'apoptose (Guo *et al.*, 2004). Encore une fois, cette surexpression si elle se confirme, est cohérente avec le rôle protecteur de Nrf-2 non seulement en situation de stress toxique ou oxydatif, mais plus spécifiquement en cas de stress mitochondrial (Calkins *et al.*, 2004 ; Shih *et al.*, 2005). Or, le stress mitochondrial a été récemment mis en relation avec les maladies cardio-vasculaires (Ballinger, 2005).

Plusieurs promoteurs de gènes codant pour des protéines identifiées, bien qu'ils ne contiennent pas de site de liaison pour le facteur de transcription Nrf-2, possèdent des sites de liaison pour NF- κ B. Ceci est conforme aux effets pro-inflammatoires associés aux LDL oxydées.

3. ETUDE DE LA SUREXPRESSION DE GCLM APRES STIMULATION DES MACROPHAGES AVEC DES LDL OXYDEES PAR WESTERN BLOT

Afin de confirmer les résultats obtenus par PCR en temps réel et en protéomique, nous avons réalisé un Western Blot sur la sous-unité régulatrice de la glutamate cystéine ligase.

1. Résultats

Les protéines de macrophages stimulés pendant 6, 12, ou 24 heures aux LDL oxydées ou natives à une concentration de 50 μ g/ml ont été extraites. Pour chaque temps de stimulation, un contrôle dans lequel les macrophages n'ont pas été stimulés aux LDL oxydées est réalisé.

Après migration des échantillons et transfert sur membrane, la protéine est révélée. L'anticorps primaire, dirigé contre la Gclm, est dilué 5000 fois et l'anticorps secondaire, dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à la 'horse radish peroxidase', est dilué 200.000 fois. En chambre noire, le film photo est placé 20 secondes sur la membrane avant d'être révélé. Le résultat obtenu est illustré à la figure III.20.A. Le film est ensuite scanné afin de quantifier les différentes bandes obtenues. Nous réalisons également la révélation et la quantification de la tubuline afin de normaliser les résultats obtenus pour la Gclm (Figure III.20.A.).

Une seule bande est observée après révélation de la Gclm. De plus, cette bande se trouve légèrement en dessous de 36 kDa, ce qui est conforme au poids moléculaire de 31 kDa, décrit pour la Gclm. Après normalisation de la quantification des bandes obtenues pour Gclm par rapport à la tubuline, l'expression de cette protéine a été rapportée aux conditions contrôles (Figure III.20.B.).

Que ce soit après 6 h, 12 h ou 24 h de stimulation avec des LDL natives, on remarque que les macrophages ne surexpriment pas la Gclm. En effet, le niveau d'expression de la Gclm après stimulation aux LDL natives est comparable à celui des macrophages non stimulés. Par contre, on observe clairement une surexpression de la Gclm lorsque les macrophages sont stimulés avec des LDL oxydées. Cette surexpression est déjà de l'ordre de 2 fois après 6 heures de stimulation. Après 12 et 24 heures de stimulation avec des LDL oxydées, l'expression de la Gclm est respectivement 7.4 et 9.9 fois plus élevée que dans la condition contrôle. Notons que la quantité de Gclm dans le 'contrôle 6 h' est plus élevée qu'à 12 et 24 h. Cela est peut-être dû au changement de milieu opéré juste avant stimulation.

2. Discussion

Ces résultats obtenus en Western Blot sur la Gclm permettent de confirmer ceux obtenus par PCR en temps réel sur le gène *Gclm*, ainsi que ceux obtenus en protéomique par l'approche 2D-DIGE. En effet, nous observons une surexpression de la Gclm après stimulation des macrophages aux LDL oxydées. De plus, comme nous l'avons également montré par PCR en temps réel, cette surexpression est spécifiquement induite par les LDL oxydées, la stimulation des macrophages avec des LDL natives ne montrant aucune surexpression de la Gclm, même après 24 heures. En PCR en temps réel, nous observons un pic de surexpression du gène *Gclm* après 6 heures de stimulation aux LDL oxydées. En Western Blot, nous observons une surexpression de la Gclm qui s'amplifie au cours du temps et atteint une valeur 9,9 fois supérieure à celle du contrôle après 24 heures de stimulation des macrophages aux LDL oxydées. Or, après analyse des variations protéiques entre des macrophages stimulés ou non pendant 24 heures aux LDL oxydées par la technique du 2D-DIGE, nous avons réussi à identifier la Gclm mais son expression n'était que 2,87 fois supérieure dans les cellules stimulées avec des LDL oxydées par rapport aux cellules contrôles. Cette différence peut venir du fait que bien que les gels bidimensionnels avec l'approche DIGE aient une excellente sensibilité, le Western Blot est une technique encore plus sensible, en tous les cas, quand l'anticorps primaire est de bonne qualité. De plus, en protéomique, il se peut qu'une certaine quantité de protéines soit perdue, soit lors de l'extraction protéique, soit lors des migrations. Moellering *et al.* (2002) avaient réalisé un Western Blot sur des échantillons protéiques de cellules endothéliales stimulées ou non pendant 16 heures avec des LDL oxydées à une concentration de 150 µg/ml. Ils observaient une augmentation de l'abondance de la Gclm de l'ordre de 3.5 fois. Il semble donc que les macrophages soient beaucoup plus sensibles aux LDL oxydées que les cellules endothéliales, en tout cas, en ce qui concerne l'induction du gène *Gclm*. Néanmoins, ces deux types cellulaires diffèrent également quantitativement et qualitativement en ce qui concerne les récepteurs 'scavengers' qu'ils portent en surface.

En résumé, les résultats obtenus, que ce soit par PCR en temps réel, par gels bidimensionnels ou par Western Blot vont tous dans le même sens. Ils montrent tous une surexpression de Gclm après stimulation des macrophages murins RAW 264.7 avec des LDL oxydées, à une concentration de 50 µg/ml. Ces résultats sont encourageants et il est clair qu'il faudrait confirmer les variations d'abondance observées en gel 2D-DIGE pour d'autres protéines.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce mémoire était d'étudier les effets des LDL natives ou modifiées (acétylées ou oxydées) sur les macrophages par une approche protéomique dans le cadre des travaux de l'URBC dans le contexte de l'athérosclérose. Dans le processus de développement de l'athérosclérose, les macrophages sont exposés, dans l'intima, aux LDL oxydées. L'internalisation massive et non contrôlée de LDL oxydées par les macrophages via les récepteurs 'scavengers' va conduire à la formation de cellules spumeuses, composant majoritairement la plaque d'athérome. Les LDL oxydées sont de plus cytotoxiques pour les macrophages et régulent l'expression d'un grand nombre de gènes. Dans le but d'identifier un maximum de protéines dont l'abondance varie après stimulation des macrophages avec des LDL oxydées, nous avons choisi une approche protéomique, et plus particulièrement les gels bidimensionnels.

Tout d'abord, dans le but de valider les conditions de stimulation des macrophages murins RAW 264.7 utilisés, nous avons vérifié les effets des LDL oxydées décrits dans la littérature, sur l'expression de la Gclm. Cette mise au point nous a permis de constater que la qualité de l'oxydation des LDL est critique pour induire ou non des gènes.

Les conditions de stimulation établies, nous avons réalisé des gels 2D-DIGE afin de repérer les protéines dont l'abondance variait après stimulation des macrophages avec des LDL oxydées. Un temps de stimulation de 24 heures s'est avéré nécessaire pour observer plusieurs variations d'abondance protéique. A ce temps de stimulation, 20 spots ont été répertoriés, dont 15 montraient une augmentation d'abondance. Les protéines présentes dans 14 des 20 spots d'intérêt ont pu être identifiées par spectrométrie de masse. Mais malgré une gamme de pH assez restreinte (4-7), seulement 9 spots contenaient une seule protéine.

Des analyses en gels 2D avaient déjà été réalisées sur des macrophages stimulés aux LDL oxydées par l'équipe de Yu *et al.* (2003). Cette équipe avait effectué une étude globale des protéines montrant une variation d'abondance après stimulation de macrophages dérivés des monocytes humains U937 avec des LDL oxydées. Cependant, aucune identification de protéines n'avait été réalisée. Fach et son équipe (2004) ont, quant à eux, effectué une analyse des variations d'abondance des protéines sécrétées dans le milieu de culture par les monocytes humains THP-1 différenciés en macrophages et stimulés aux LDL oxydées ou natives. Plusieurs protéines montraient une variation d'abondance, et notamment les cathepsines, dont la cathepsine D que nous avons également identifiée. Li et Yuan (2004) avaient également montré une surexpression de la cathepsine D après une exposition des macrophages à un stress oxydatif.

Signalons également les travaux de Xiao *et al.* (2003). Cette équipe étudie les effets de particules de gaz d'échappement diesel, à doses croissantes, sur les macrophages RAW 264.7, par l'approche protéomique. Ces particules sont connues pour induire un stress oxydatif et elles diminuent le rapport GSH/GSSG de manière dose-dépendante.

Il est difficile de comparer l'ensemble de ces données. Par ailleurs, nous devons rester très prudents, tant que les surexpressions décelées en gels 2D-DIGE ne sont pas confirmées par d'autres méthodes telles que le Western blot, ce qui n'a été fait que pour la Gclm.

Néanmoins, nos résultats sont cohérents avec la littérature et suggèrent un rôle clef pour le facteur transcriptionnel Nrf-2, qui se lie au motif 'ARE' et induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans des processus de détoxification et antioxydants. Il jouerait également un rôle protecteur dans certains contextes pathologiques tels que l'inflammation (pour une revue, voir Motohashi et Yamamoto (2004)). Des études sur des macrophages prélevés à partir de souris knock-out pour le facteur de transcription Nrf-2 ont déjà été

réalisées et ont permis d'identifier de nombreux gènes dont l'expression dépend de ce facteur de transcription et de sa liaison au site 'ARE' (Thimmulappa *et al.*, 2002).

Lors de l'analyse des protéines identifiées, nous retrouvons, sans surprise, la Gclm et la G6pd, 2 protéines dont on sait qu'elles contiennent plusieurs sites 'ARE' dans le promoteur de leur gène. Nous retrouvons également d'autres protéines qui ont déjà été décrites dans la littérature comme possédant des sites de liaison pour le facteur de transcription Nrf-2. Il s'agit de la carbonyl réductase, la transaldolase et l'aldo-kéto réductase (Thimmulappa *et al.*, 2002).

Il peut sembler étonnant de ne pas retrouver, parmi les protéines identifiées, certains gènes dont l'expression est régulée par PPAR α , celui-ci étant activé par les produits d'oxydation des LDL oxydées. Cependant, les cibles de PPAR α sont, entre autres, les gènes codant pour les récepteurs 'scavengers' CD 36 ou SR-B I, deux protéines membranaires. Or, il a déjà été signalé que lors de la migration en 1^{ère} dimension, les protéines hydrophobes et plus particulièrement les protéines membranaires pouvaient précipiter. De plus, PPAR α induit sa propre expression, mais PPAR α étant un facteur de transcription, il n'est présent qu'en très faible quantité dans la cellule. Le 'dynamic range' des gels en 2D-DIGE étant de l'ordre de 10⁵, les protéines très peu abondantes ne seront pas visibles sur le gel. Un Western blot permettrait de vérifier si l'expression de PPAR α est modifiée après 24 heures d'incubation avec des LDL oxydées.

Une perspective directe de ce travail sera de s'orienter vers de la subprotéomique, pour encore diminuer le risque d'avoir plusieurs protéines dans un seul spot et pour augmenter les chances de détection de protéines peu abondantes, mais qui seraient régulées par les LDL oxydées. Celle-ci consiste à restreindre encore plus la gamme de pH, à effectuer un pré-fractionnement des échantillons protéiques sur base des propriétés physico-chimiques des protéines, ou à effectuer des gels bidimensionnels sur des protéines extraites à partir d'une fraction purifiée en une organelle. La réalisation de gels bidimensionnels sur des fractions purifiées en mitochondries est une perspective intéressante, vu qu'il a été montré qu'un dysfonctionnement mitochondrial pouvait être à l'origine de maladies cardio-vasculaires (Ballinger, 2005). Or plusieurs équipes ont montré récemment que Nrf-2 joue également un rôle protecteur en cas de dysfonctionnement mitochondrial (Shih *et al.*, 2005 ; Calkins *et al.*, 2005).

Par ailleurs, nous disposons au laboratoire d'outils complémentaires, qui nous permettraient d'avoir une meilleure vision des effets des LDL oxydées sur les macrophages. Signalons l'ADIPOCHIP', un damier à ADN, mis au point au laboratoire (Van Koningsloo *et al.*, en préparation). Ce damier porte 89 sondes de capture pour suivre l'expression génique au niveau ARNm de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire, mais aussi dans le métabolisme glucidique et lipidique, la réponse inflammatoire, ... Plusieurs facteurs de transcription sont également analysés, dont PPAR α , ainsi que des gènes cibles de celui-ci. Bien que ce damier ait été mis au point pour suivre l'expression génique dans des modèles *in vitro* de pré-adipocytes en cours de différenciation et dans le tissu adipeux de modèles de souris relevant dans le contexte de l'athérosclérose, il constitue un outil relevant pour la biologie des cellules spumeuses, qui comme l'adipocyte accumule les lipides.

Un damier 'Inflammation' est également en cours de développement par la société Eppendorf Array Technology. Des expériences de validation pour ce damier à ADN sont planifiées avec pour modèle cellulaire les RAW 264.7, déjà utilisées lors de ce mémoire. Dans une première étape de validation du damier, le LPS (lipopolysaccharide) sera utilisé comme contrôle positif. Ses effets ont été largement documentés et il est clairement établi qu'il génère une réponse de type inflammatoire chez les monocytes – macrophages (Guha *et al.* 2001, Hashimoto *et al.* 2003, Rouzer *et al.* 2005, Sweet et Hume, 1996).

Par ailleurs, les contributions respectives de la voie 'PI3K-mTOR' et de la voie 'NF- κ B', décrites comme impliquées dans les réponses au LPS (Kristof *et al.* 2003, Potter *et al.* 2001, Weinstein *et al.* 2000) seront précisées. Pour cela, les effets d'inhibiteurs spécifiques de NF- κ B d'une part (BAY 11-7082) et de la voie PI3K – mTOR (LY294002) d'autre part, seront étudiés sur la réponse des macrophages RAW 264.7 au LPS.

Dans une seconde étape de validation du damier à ADN, la réponse des cellules RAW 264.7 aux LDL modifiées sera aussi abordée. Les résultats de cette étude pourront à terme être comparés à une étude protéomique complémentaire prévue sur les surnageants des cultures effectuées lors de ce mémoire. Ils ont en effet été récoltés et conservés à -80°C dans le but de compléter les résultats obtenus sur le profil d'expression des protéines intracellulaires.

Enfin, comme nous l'avons déjà signalé, les expériences réalisées lors de ce mémoire constituent la première partie d'une étude plus large visant à comparer les effets des LDL oxydées (lipotoxicité et stress oxydatif) et des LDL acétylées (lipotoxicité) sur les macrophages, par une approche protéomique de type 2D-DIGE.

L'approche protéomique devrait permettre d'obtenir des informations sur les gènes régulés par un stress oxydatif et ceux régulés par une surcharge lipidique. Ces données permettraient alors de mieux comprendre le rôle des macrophages dans les mécanismes de développement des lésions athérosclérotiques. A moyen terme, ce travail devrait également permettre de mieux cerner les rôles respectifs des facteurs de transcription Nrf-2 et PPAR α et de voir dans quelle mesure ils contribuent à protéger le macrophage contre l'apoptose, effectivement observée au sein des lésions athérosclérotiques. Une protection contre l'apoptose semble stabiliser les lésions et diminuer les risques de rupture (Kockx et Herman, 2000).

V. BIBLIOGRAPHIE

- Aviram, M., Rosenblat, M., Etzioni, A. & Levy, R. Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism* **45**, 1069-79 (1996).
- Badimon, L. & Martinez-Gonzalez, J. Endothelium and vascular protection: an update. *Rev Esp Cardiol* **55**, 17-26 (2002).
- Ballinger, S. W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* **38**, 1278-95 (2005).
- Barrier, M. & Mirkes, P. E. Proteomics in developmental toxicology. *Reprod Toxicol* **19**, 291-304 (2005).
- Barter, P. The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atheroscler Suppl* **6**, 15-20 (2005).
- Bea, F., Hudson, F. N., Chait, A., Kavanagh, T. J. & Rosenfeld, M. E. Induction of glutathione synthesis in macrophages by oxidized low-density lipoproteins is mediated by consensus antioxidant response elements. *Circ Res* **92**, 386-93 (2003).
- Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D. & Lusis, A. J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* **91**, 2488-96 (1995).
- Biardi, L. & Krisans, S. K. Compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Conversion of mevalonate to farnesyl diphosphate occurs in the peroxisomes. *J Biol Chem* **271**, 1784-8 (1996).
- Binz, S. K., Sheehan, A. M. & Wold, M. S. Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1015-24 (2004).
- Cabre, A., Girona, J., Vallve, J. C., Heras, M. & Masana, L. Cytotoxic effects of the lipid peroxidation product 2,4-decadienal in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **169**, 245-50 (2003).
- Calkins, M. J., Jakel, R. J., Johnson, D. A., Chan, K., Kan, Y. W. & Johnson, J. A. Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 244-9 (2005).
- Camejo, G., Hurt, E., Wiklund, O., Rosengren, B., Lopez, F. & Bondjers, G. Modifications of low-density lipoprotein induced by arterial proteoglycans and chondroitin-6-sulfate. *Biochim Biophys Acta* **1096**, 253-61 (1991).
- Camejo, G., Olofsson, S. O., Lopez, F., Carlsson, P. & Bondjers, G. Identification of Apo B-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* **8**, 368-77 (1988).
- Capron, L. & Bruneval, P. [Participation of platelets in the progression of atherosclerosis]. *Rev Prat* **39**, 2207-14 (1989).
- Carr, A. C., McCall, M. R. & Frei, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1716-23 (2000).
- Chapman, M. J., Guerin, M. & Bruckert, E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J* **19 Suppl A**, A24-30 (1998).
- Chase, A. J. & Newby, A. C. Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res* **40**, 329-43 (2003).
- Chatterjee, S. Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem* **111**, 143-7 (1992).
- Chen, J., Tung, C. H., Mahmood, U., Ntziachristos, V., Gyurko, R., Fishman, M. C., Huang, P. L. & Weissleder, R. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* **105**, 2766-71 (2002).
- Chisolm, G. M. & Steinberg, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* **28**, 1815-26 (2000).

- Coetzee, G. A. & Chait, A. Scavenger lipoprotein receptors are more effective in ligand internalization than low density lipoprotein receptors in human monocyte-macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **116**, 626-32 (1983).
- Cohen, P. T. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241-56 (2002).
- Corvilain, B. [Lipoprotein metabolism]. *Rev Med Brux* **18**, 3-9 (1997).
- Cristea, I. M., Gaskell, S. J. & Whetton, A. D. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* **103**, 3624-34 (2004).
- Darley-Usmar, V. M., Severn, A., O'Leary, V. J. & Rogers, M. Treatment of macrophages with oxidized low-density lipoprotein increases their intracellular glutathione content. *Biochem J* **278** (Pt 2), 429-34 (1991).
- Davies, J. R., Rudd, J. H. & Weissberg, P. L. Molecular and metabolic imaging of atherosclerosis. *J Nucl Med* **45**, 1898-907 (2004).
- de Winther, M. P., van Dijk, K. W., Havekes, L. M. & Hofker, M. H. Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 290-7 (2000).
- Dickinson, D. A., Levonen, A. L., Moellering, D. R., Arnold, E. K., Zhang, H., Darley-Usmar, V. M. & Forman, H. J. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med* **37**, 1152-9 (2004).
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T. & Protter, A. A. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* **268**, 11811-6 (1993).
- Erickson, A. M., Nevarea, Z., Gipp, J. J. & Mulcahy, R. T. Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence. *J Biol Chem* **277**, 30730-7 (2002).
- Fach, E. M., Garulacan, L. A., Gao, J., Xiao, Q., Storm, S. M., Dubaquie, Y. P., Hefta, S. A. & Opiteck, G. J. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics* **3**, 1200-10 (2004).
- Febbraio, M., Hajjar, D. P. & Silverstein, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* **108**, 785-91 (2001).
- Forman, H. J. & Torres, M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* **22**, 189-216 (2001).
- Fujii, J. & Ikeda, Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* **7**, 123-30 (2002).
- Gibbons, G. F., Wiggins, D., Brown, A. M. & Hebbachi, A. M. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* **32**, 59-64 (2004).
- Ginsberg, H. N. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* **27**, 503-19 (1998).
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. & Brown, M. S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 333-7 (1979).
- Graves, P. R. & Haystead, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 39-63; table of contents (2002).
- Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* **13**, 85-94 (2001).
- Guo, Y., Cheong, N., Zhang, Z., De Rose, R., Deng, Y., Farber, S. A., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Tim50, a component of the mitochondrial translocator, regulates mitochondrial integrity and cell death. *J Biol Chem* **279**, 24813-25 (2004).
- Guttman, A., Varoglu, M. & Khandurina, J. Multidimensional separations in the pharmaceutical arena. *Drug Discov Today* **9**, 136-44 (2004).

- Hackam, D. G. & Anand, S. S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *Jama* **290**, 932-40 (2003).
- Hakala, J. K., Oksjoki, R., Laine, P., Du, H., Grabowski, G. A., Kovanen, P. T. & Pentikainen, M. O. Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1430-6 (2003).
- Hakamata, H., Miyazaki, A., Sakai, M., Sakamoto, Y. I. & Horiuchi, S. Cytotoxic effect of oxidized low density lipoprotein on macrophages. *J Atheroscler Thromb* **5**, 66-75 (1998).
- Han, J., Hajjar, D. P., Febbraio, M. & Nicholson, A. C. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* **272**, 21654-9 (1997).
- Hashimoto, S., Morohoshi, K., Suzuki, T. & Matsushima, K. Lipopolysaccharide-inducible gene expression profile in human monocytes. *Scand J Infect Dis* **35**, 619-27 (2003).
- Hayashida, K., Kume, N., Minami, M. & Kita, T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) supports adhesion of mononuclear leukocytes and a monocyte-like cell line THP-1 cells under static and flow conditions. *FEBS Lett* **511**, 133-8 (2002).
- Herman, I. M. Endothelial cell matrices modulate smooth muscle cell growth, contractile phenotype and sensitivity to heparin. *Haemostasis* **20 Suppl 1**, 166-77 (1990).
- Hoang, V. M., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Blonder, J., Terunuma, A., Vogel, J. C. & Fisher, R. J. Quantitative proteomics employing primary amine affinity tags. *J Biomol Tech* **14**, 216-23 (2003).
- Hourton, D., Delerive, P., Stankova, J., Staels, B., Chapman, M. J. & Ninio, E. Oxidized low-density lipoprotein and peroxisome-proliferator-activated receptor alpha down-regulate platelet-activating-factor receptor expression in human macrophages. *Biochem J* **354**, 225-32 (2001).
- Hsu, H. Y., Chiu, S. L., Wen, M. H., Chen, K. Y. & Hua, K. F. Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* **276**, 28719-30 (2001).
- Hulten, L. M., Ullstrom, C., Krettek, A., van Reyk, D., Marklund, S. L., Dahlgren, C. & Wiklund, O. Human macrophages limit oxidation products in low density lipoprotein. *Lipids Health Dis* **4**, 6 (2005).
- Hurt-Camejo, E., Camejo, G., Rosengren, B., Lopez, F., Ahlstrom, C., Fager, G. & Bondjers, G. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* **12**, 569-83 (1992).
- Hussain, M. M., Strickland, D. K. & Bakillah, A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr* **19**, 141-72 (1999).
- Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D. S., Unoki, H., Yamamoto, M. & Mann, G. E. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res* **94**, 609-16 (2004).
- Ismail, N. A., Alavi, M. Z. & Moore, S. Isolation of lipoprotein-proteoglycan complexes from balloon catheter deendothelialized aortas and the uptake of these complexes by blood monocyte-derived macrophages. *Pathology* **26**, 145-53 (1994).
- Itabe, H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* **26**, 1-9 (2003).
- Jain, M., Cui, L., Brenner, D. A., Wang, B., Handy, D. E., Leopold, J. A., Loscalzo, J., Apstein, C. S. & Liao, R. Increased myocardial dysfunction after ischemia-reperfusion in mice lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Circulation* **109**, 898-903

- (2004).
- Jentzsch, A. M., Bachmann, H., Furst, P. & Biesalski, H. K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* **20**, 251-6 (1996).
 - Kirchhausen, T., Fless, G. & Scanu, A. M. The structure of plasma low density lipoproteins: experimental facts and interpretations--a minireview. *Lipids* **15**, 464-7 (1980).
 - Kockx, M. M. & Herman, A. G. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* **45**, 736-46 (2000).
 - Kohno, M., Yokokawa, K., Yasunari, K., Minami, M., Kano, H., Hanehira, T. & Yoshikawa, J. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation* **98**, 353-9 (1998).
 - Kolodgie, F. D., Gold, H. K., Burke, A. P., Fowler, D. R., Kruth, H. S., Weber, D. K., Farb, A., Guerrero, L. J., Hayase, M., Kutys, R., Narula, J., Finn, A. V. & Virmani, R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* **349**, 2316-25 (2003).
 - Krause, B. R. & Auerbach, B. J. Reverse cholesterol transport and future pharmacological approaches to the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* **2**, 375-81 (2001).
 - Krisans, S. K., Ericsson, J., Edwards, P. A. & Keller, G. A. Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisomes. *J Biol Chem* **269**, 14165-9 (1994).
 - Kristof, A. S., Marks-Konczalik, J., Billings, E. & Moss, J. Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem* **278**, 33637-44 (2003).
 - Kruth, H. S., Zhang, W. Y., Skarlatos, S. I. & Chao, F. F. Apolipoprotein B stimulates formation of monocyte-macrophage surface-connected compartments and mediates uptake of low density lipoprotein-derived liposomes into these compartments. *J Biol Chem* **274**, 7495-500 (1999).
 - Kume, N. & Kita, T. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med* **11**, 22-5 (2001).
 - Le Jossic-Corcus, C., Pastori, G. M., Duclos, S., Kawabe, Y., Pineau, T. & Bournot, P. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) activators induce hepatic farnesyl diphosphate synthase gene expression in rodents. *J Steroid Biochem Mol Biol* **88**, 203-11 (2004).
 - Li, W. & Yuan, X. M. Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1030**, 427-33 (2004).
 - Lindholm, M. W., Nilsson, J. & Moses, J. Low density lipoprotein stimulation of human macrophage proteoglycan secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 455-60 (2005).
 - Linton, M. F. & Fazio, S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**, S35-40 (2003).
 - Luan, Z., Chase, A. J. & Newby, A. C. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 769-75 (2003).
 - Maeda, M., Yamamoto, I., Fujio, Y. & Azuma, J. Homocysteine induces vascular endothelial growth factor expression in differentiated THP-1 macrophages. *Biochim Biophys Acta* **1623**, 41-6 (2003).
 - Maier, J. A., Barenghi, L., Bradamante, S. & Pagani, F. Induction of human endothelial cell growth by mildly oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis* **123**, 115-21 (1996).

- Massberg, S., Vogt, F., Dickfeld, T., Brand, K., Page, S. & Gawaz, M. Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thromb Res* **110**, 187-94 (2003).
- Mayeur, G. L., Fraser, C. S., Peiretti, F., Block, K. L. & Hershey, J. W. Characterization of eIF3k: a newly discovered subunit of mammalian translation initiation factor eIF3. *Eur J Biochem* **270**, 4133-9 (2003).
- McMurray, H. F., Parthasarathy, S. & Steinberg, D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* **92**, 1004-8 (1993).
- Mietus-Snyder, M., Gowri, M. S. & Pitas, R. E. Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation. *J Biol Chem* **275**, 17661-70 (2000).
- Moellering, D. R., Levenon, A. L., Go, Y. M., Patel, R. P., Dickinson, D. A., Forman, H. J. & Darley-Usmar, V. M. Induction of glutathione synthesis by oxidized low-density lipoprotein and 1-palmitoyl-2-arachidonyl phosphatidylcholine: protection against quinone-mediated oxidative stress. *Biochem J* **362**, 51-9 (2002).
- Mori, S. & Saito, Y. [Phenotypic change of the smooth muscle cell and atherosclerosis]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **107**, 161-70 (1996).
- Motohashi, H. & Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* **10**, 549-57 (2004).
- Nagase, M., Ando, K., Nagase, T., Kaname, S., Sawamura, T. & Fujita, T. Redox-sensitive regulation of lox-1 gene expression in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 720-5 (2001).
- Nguyen, T., Sherratt, P. J. & Pickett, C. B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 233-60 (2003).
- Nishinaka, T. & Yabe-Nishimura, C. Transcription factor Nrf2 regulates promoter activity of mouse aldose reductase (AKR1B3) gene. *J Pharmacol Sci* **97**, 43-51 (2005).
- Nordestgaard, B. G. The vascular endothelial barrier--selective retention of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **7**, 269-73 (1996).
- Okado-Matsumoto, A., Matsumoto, A., Fujii, J. & Taniguchi, N. Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced conditions. *J Biochem (Tokyo)* **127**, 493-501 (2000).
- Olsson, U., Ostergren-Lunden, G. & Moses, J. Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction. *Glycoconj J* **18**, 789-97 (2001).
- Ordovas, J. M. in *Methods in Molecular Biology* (ed. Press, E. H.) (1998).
- Osterud, B. & Bjorklid, E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* **83**, 1069-112 (2003).
- Pepine, C. J. Why vascular biology matters. *Am J Cardiol* **88**, 5K-9K (2001).
- Petit, L., Lesnik, P., Dacet, C., Moreau, M. & Chapman, M. J. Tissue factor pathway inhibitor is expressed by human monocyte-derived macrophages : relationship to tissue factor induction by cholesterol and oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 309-15 (1999).
- Potter, M. W., Shah, S. A., Elbirt, K. K. & Callery, M. P. Endotoxin (LPS) stimulates 4E-BP1/PHAS-I phosphorylation in macrophages. *J Surg Res* **97**, 54-9 (2001).
- Pradet-Balade, B., Boulme, F., Beug, H., Mullner, E. W. & Garcia-Sanz, J. A. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends Biochem Sci* **26**, 225-9 (2001).
- Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, L. G. & Steinberg, D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of

- monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2995-8 (1987).
- Rabilloud, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10 (2002).
 - Rabilloud, T., Strub, J. M., Luche, S., van Dorsselaer, A. & Lunardi, J. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**, 699-704 (2001).
 - Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Rodriguez Gabriel, M. A., Guarinos, E. & Ballesta, J. P. Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem Cell Biol* **73**, 959-68 (1995).
 - Richter, Y., Groothuis, A., Seifert, P. & Edelman, E. R. Dynamic flow alterations dictate leukocyte adhesion and response to endovascular interventions. *J Clin Invest* **113**, 1607-14 (2004).
 - Rigotti, A., Miettinen, H. E. & Krieger, M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev* **24**, 357-87 (2003).
 - Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-9 (1993).
 - Ross, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **57**, 791-804 (1995).
 - Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-26 (1999).
 - Ross, R., Glomset, J. & Harker, L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* **86**, 675-84 (1977).
 - Rouzer, C. A., Jacobs, A. T., Nirodi, C. S., Kingsley, P. J., Morrow, J. D. & Marnett, L. J. RAW264.7 cells lack prostaglandin-dependent autoregulation of tumor necrosis factor-alpha secretion. *J Lipid Res* **46**, 1027-37 (2005).
 - Rudd, J. H., Davies, J. R. & Weissberg, P. L. Imaging of atherosclerosis -- can we predict plaque rupture? *Trends Cardiovasc Med* **15**, 17-24 (2005).
 - Rudenko, G. & Deisenhofer, J. The low-density lipoprotein receptor: ligands, debates and lore. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 683-9 (2003).
 - Sacco, R. L., Wolf, P. A. & Gorelick, P. B. Risk factors and their management for stroke prevention: outlook for 1999 and beyond. *Neurology* **53**, S15-24 (1999).
 - Schiller, J., Suss, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Lessig, J., Muller, M., Petkovic, M., Spalteholz, H., Zschornig, O. & Arnold, K. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res* **43**, 449-88 (2004).
 - Schini-Kerth, V. B. Homocysteine, a proinflammatory and proatherosclerotic factor: role of intracellular reactive oxygen species. *Circ Res* **93**, 271-3 (2003).
 - Schratzberger, P., Duzendorfer, S., Reinisch, N., Kahler, C. M., Herold, M. & Wiedermann, C. J. Release of chemoattractants for human monocytes from endothelial cells by interaction with neutrophils. *Cardiovasc Res* **38**, 516-21 (1998).
 - Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H. & Dashti, N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* **42**, 1346-67 (2001).
 - Sekikawa, A., Satoh, T., Hayakawa, T., Ueshima, H. & Kuller, L. H. Coronary heart disease mortality among men aged 35-44 years by prefecture in Japan in 1995-1999 compared with that among white men aged 35-44 by state in the United States in 1995-1998: vital statistics data in recent birth cohort. *Jpn Circ J* **65**, 887-92 (2001).
 - Sevastian, A., Hodis, H. N., Hwang, J., McLeod, L. L. & Peterson, H. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J Lipid Res* **36**, 1971-86 (1995).

- Shatrov, V. A., Sumbayev, V. V., Zhou, J. & Brune, B. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood* **101**, 4847-9 (2003).
- Shen, C. & Nathan, C. Nonredundant antioxidant defense by multiple two-cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells. *Mol Med* **8**, 95-102 (2002).
- Shen, C. M., Mao, S. J., Huang, G. S., Yang, P. C. & Chu, R. M. Stimulation of smooth muscle cell proliferation by ox-LDL- and acetyl LDL-induced macrophage-derived foam cells. *Life Sci* **70**, 443-52 (2001).
- Shen, L. & Sevanian, A. OxLDL induces macrophage gamma-GCS-HS protein expression: a role for oxLDL-associated lipid hydroperoxide in GSH synthesis. *J Lipid Res* **42**, 813-23 (2001).
- Shih, A. Y., Imbeault, S., Barakauskas, V., Erb, H., Jiang, L., Li, P. & Murphy, T. H. Induction of the Nrf2-driven Antioxidant Response Confers Neuroprotection during Mitochondrial Stress in Vivo. *J Biol Chem* **280**, 22925-36 (2005).
- Simionescu, M. & Simionescu, N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *Faseb J* **7**, 1359-66 (1993).
- Solis, W. A., Dalton, T. P., Dieter, M. Z., Freshwater, S., Harrer, J. M., He, L., Shertzer, H. G. & Nebert, D. W. Glutamate-cysteine ligase modifier subunit: mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress. *Biochem Pharmacol* **63**, 1739-54 (2002).
- Steinberg, D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* **131 Suppl**, S5-7 (1997).
- Stocker, R. & Keaney, J. F., Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* **84**, 1381-478 (2004).
- Sweet, M. J. & Hume, D. A. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol* **60**, 8-26 (1996).
- Szyszka, R. Protein kinases phosphorylating acidic ribosomal proteins from yeast cells. *Folia Microbiol (Praha)* **44**, 142-52 (1999).
- Takei, H., Strong, J. P., Yutani, C. & Malcom, G. T. Comparison of coronary and aortic atherosclerosis in youth from Japan and the USA. *Atherosclerosis* **180**, 171-9 (2005).
- Tao, Z., Smart, F. W., Figueroa, J. E., Glancy, D. L. & Vijayagopal, P. Elevated expression of proteoglycans in proliferating vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **135**, 171-9 (1997).
- Tedgui, A. & Mallat, Z. [Atherosclerotic plaque formation]. *Rev Prat* **49**, 2081-6 (1999).
- Terpstra, V., van Amersfoort, E. S., van Velzen, A. G., Kuiper, J. & van Berkel, T. J. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1860-72 (2000).
- Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M. & Biswal, S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* **62**, 5196-203 (2002).
- Torzewski, M., Klouche, M., Hock, J., Messner, M., Dorweiler, B., Torzewski, J., Gabbert, H. E. & Bhakdi, S. Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 369-78 (1998).
- Trigatti, B. L., Krieger, M. & Rigotti, A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1732-8 (2003).
- Van Lenten, B. J., Fogelman, A. M., Hokom, M. M., Benson, L., Haberland, M. E. & Edwards, P. A. Regulation of the uptake and degradation of beta-very low density lipoprotein in human monocyte macrophages. *J Biol Chem* **258**, 5151-7 (1983).

- Varadhachary, A. S., Monestier, M. & Salgame, P. Reciprocal induction of IL-10 and IL-12 from macrophages by low-density lipoprotein and its oxidized forms. *Cell Immunol* **213**, 45-51 (2001).
- Via, D. P., Kempner, E. S., Pons, L., Fanslow, A. E., Vignale, S., Smith, L. C., Gotto, A. M., Jr. & Dresel, H. A. Mouse macrophage receptor for acetylated low density lipoprotein: demonstration of a fully functional subunit in the membrane and with purified receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6780-4 (1992).
- Via, D. P., Plant, A. L., Craig, I. F., Gotto, A. M., Jr. & Smith, L. C. Metabolism of normal and modified low-density lipoproteins by macrophage cell lines of murine and human origin. *Biochim Biophys Acta* **833**, 417-28 (1985).
- Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R., 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7 (2001).
- Wasserman, W. W. & Fahl, W. E. Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5361-6 (1997).
- Weinstein, S. L., Finn, A. J., Dave, S. H., Meng, F., Lowell, C. A., Sanghera, J. S. & DeFranco, A. L. Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon-beta. *J Leukoc Biol* **67**, 405-14 (2000).
- Whitman, S. C., Daugherty, A. & Post, S. R. Regulation of acetylated low density lipoprotein uptake in macrophages by pertussis toxin-sensitive G proteins. *J Lipid Res* **41**, 807-13 (2000).
- Willnow, T. E., Nykjaer, A. & Herz, J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* **1**, E157-62 (1999).
- Wong, C. M., Chun, A. C., Kok, K. H., Zhou, Y., Fung, P. C., Kung, H. F., Jeang, K. T. & Jin, D. Y. Characterization of human and mouse peroxiredoxin IV: evidence for inhibition by Prx-IV of epidermal growth factor- and p53-induced reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* **2**, 507-18 (2000).
- Xiao, D., Wang, Z. & She, M. Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 expression in vivo and a novel model for monocyte adhesion to arterial intima. *Chin Med J (Engl)* **112**, 438-42 (1999).
- Xiao, G. G., Wang, M., Li, N., Loo, J. A. & Nel, A. E. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem* **278**, 50781-90 (2003).
- Yamamoto, C., Wakata, T., Fujiwara, Y. & Kaji, T. Induction of synthesis of a large heparan sulfate proteoglycan, perlecan, by thrombin in cultured human coronary smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1722**, 92-102 (2005).
- Yang, C. Y., Chen, S. H., Gianturco, S. H., Bradley, W. A., Sparrow, J. T., Tanimura, M., Li, W. H., Sparrow, D. A., DeLoof, H., Rosseneu, M. & et al. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* **323**, 738-42 (1986).
- Yu, K. C., Chen, W. & Cooper, A. D. LDL receptor-related protein mediates cell-surface clustering and hepatic sequestration of chylomicron remnants in LDLR-deficient mice. *J Clin Invest* **107**, 1387-94 (2001).
- Yu, Y. L., Yang, P. Y., Fan, H. Z., Huang, Z. Y. & Rui, Y. C. Protein expressions in macrophage-derived foam cells: comparative analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Acta Pharmacol Sin* **24**, 873-7 (2003).