



HAL
open science

Détermination de marqueurs physico-chimiques et biochimiques de molécules biologiques intervenant dans l'athérosclérose à partir d'études en spectroscopie Raman et en protéomique

Serge Bresson

► **To cite this version:**

Serge Bresson. Détermination de marqueurs physico-chimiques et biochimiques de molécules biologiques intervenant dans l'athérosclérose à partir d'études en spectroscopie Raman et en protéomique. Physique [physics]. Université Picardie Jules Verne, 2006. tel-04329545

HAL Id: tel-04329545

<https://hal.science/tel-04329545>

Submitted on 7 Dec 2023

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

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

Public Domain

Université de Picardie Jules Verne

**Mémoire en vue de l'obtention d'une
Habilitation à Diriger des Recherches**

Spécialité : Biophysique
section CNU : 28^{ème}

2006

**Détermination de marqueurs physico-chimiques
et biochimiques de molécules biologiques
intervenant dans l'athérosclérose à partir d'études
en spectroscopie Raman et en protéomique**

Serge BRESSON

Maître de Conférences à l'I.U.F.M. d'Amiens

**Laboratoire de biochimie, INSERM, ERI 12, EA 2087, Université de Picardie
Jules Verne, 80000 Amiens**

Membres du jury (souhaité):

M. Descamps, Professeur des universités à l'Université Lille 1

M. El Marssi, Maître de conférences habilité à l'Université de Picardie. (a accepté)

B. Khelifa, Professeur des universités à l'Université d'Artois, Lens. (a accepté)

S. Lehmann, Professeur des universités à l'Université de Montpellier, Hôpital S^t Eloi.

Z. Massy, Professeur des universités à l'Université de Picardie, faculté de médecine
(a accepté)

J.C. Mazière, Professeur des universités à l'Université de Picardie, Hôpital Nord. (a
accepté)

D. Rousseau, Professeur des universités à l'Université Ryerson, Toronto, Canada (a
accepté)

Sommaire

1 Curriculum Vitae détaillé	p3
2 Synthèse des activités de recherche	
2.1 Présentation et situation du thème de recherche	p5
2.2 Résumé du travail de thèse : « Étude vibrationnelle d'une famille d'esters du cholestérol : les cholestéryl alkanoates »	p6
2.3 Recherches effectuées après la thèse	
2.3.1 Détermination de marqueurs physico-chimique de molécules biologiques intervenant dans l'athérosclérose par spectroscopie Raman.	p8
2.3.2 Détermination de marqueurs biochimique par une étude protéomique (SELDI-TOF) de la différenciation des cellules musculaires lisses A7r5 en « osteoblast-like cells »	p17
2.4 <i>Liste de publications</i>	
2.4.1 <i>Articles dans des Revues Internationales à Comité de Lecture (17)</i>	p34
2.3.2 <i>Communications sans acte (6)</i>	p35
3 Activités d'encadrement de jeunes chercheurs	
3.1 Encadrement d'un doctorant dans le cadre d'un projet de recherche international Franco-Algérien (CMEP)	p36
3.2 Encadrement d'un stagiaire de Master 2	p36
4 Synthèse des activités d'enseignement	
4.1 Natures disciplinaires des enseignements	p36
4.2 Créations de documents pour l'enseignement	p37
4.3 Encadrement de stagiaires I.U.F.M.	p37
5 Responsabilités administratives	p37
6 Projet de recherche	
6.1 Étude de triglycérides mixés par spectroscopie Raman	p39
6.2 Études de la calcification valvulaire et vasculaire chez les animaux urémiques à l'aide de la méthode protéomique SELDI-TOF	p41
7 Bibliographie	p43
8 Annexes	p45

1. Curriculum Vitæ détaillé

Maître de Conférences en sciences physiques depuis 1999
Normalien agrégé docteur

État civil

BRESSON Serge

Né le 14/03/1967 à Dakar (Sénégal), nationalité Française

Marié, 3 enfants

Domicile : 52 Bis avenue de l'Europe – 59139 Wattignies, Tél. /Fax : (33) (0)3 20 97 14 35

Bureau : Laboratoire de Biochimie, INSERM, ERI 12, EA 2087,

Université de Picardie Jules Verne, CHU Nord, Place Victor Pauchet – 80000 Amiens

Tél. : (33) (0)3 22 66 84 59 (poste : Protéomique)

e-mail : sergebresson@yahoo.fr

Études Supérieures et expériences professionnelles

1984-1987 : Classes préparatoires aux Grandes Ecoles au lycée Marcelin Berthelot à Saint Maur-Des-Fossés (94).

1987-1988 : Licence de Physique à Paris VI, Mention Bien.

1988-1992 : **Admission à l'École Normale Supérieure de Cachan (E.N.S.)**, en section Physique Appliquée :

Licence EEA (Électronique, Électrotechnique, Automatismes) à Paris XI, Mention A.B. (1989) - Certificat de Maîtrise d'Astrophysique à Paris XI (1989).- Maîtrise EEA à Paris XI (1990).

Agrégation de Sciences Physiques, option Physique Appliquée (1991) (26^{ème} sur 66).

1991-1992 : D.E.A. de Physique des gaz et des plasmas à Paris XI, 2^{ème} sur 25, Mention Bien. Stage de D.E.A. au L.P.G.P., titre : " Interaction entre un faisceau d'électrons modulé en densité et un plasma magnétisé".

1992-1993 : Service Militaire en tant que Scientifique du Contingent à l'École Supérieure de l'Application du Matériel à Bourges.

1993-1995 : Allocataire de recherche, au Laboratoire de Physique des Gaz et des Plasmas (L.P.G.P.) sous la direction de M. Mathieussent à Paris XI.

1995-1998 : **Thèse en Sciences Physiques** de l'Université d'Artois, soutenue le 04 Novembre 1998 à la Faculté des Sciences Jean Perrin à Lens, au Laboratoire de Physico-Chimie des Interfaces et Applications (L.P.C.I.A.) sous la direction de B. Khelifa et D. Bormann, avec la mention très honorable. Sujet de thèse : "Étude des propriétés vibrationnelles d'une famille d'esters du cholestérol : les cholestéryl alkanoates".

1995-1999 : Professeur Agrégé (PRAG) en physique à l'Université d'Artois, Faculté J. Perrin, Lens.

1999-2003 : Qualifié en 28^{ème} et 30^{ème} sections (CNU) sur les emplois de maître de Conférences.

Depuis 99 : **Maître de Conférences 1^{ère} Classe à l'I.U.F.M. d'Amiens** en 28^{ème} section.

Fév.2006 : Obtention d'un **Congé pour Recherches** par mon établissement du 01 février 2006 au 01 septembre 2006

Membre de la Société Française de Biologie Clinique depuis septembre 2005, dans le groupe de travail intitulé « Protéomique ».

Membre du Marquis Who's Who 2003-2004, 2005-2006 et 2006-2007

Laboratoire de rattachement

Depuis septembre 2005, *Membre du laboratoire de Biochimie, INSERM, appartenant à l'Unité de Recherche ERI 12*, dans l'équipe de M et M^{me} Mazière. Je suis **responsable de la partie « étude en protéomique »** du laboratoire.

De mars 1998 à septembre 2005, *Membre du Centre de Calcul et de Modélisation de Lens (C.C.M.L.)*, laboratoire propre de l'Université d'Artois de la Faculté des sciences Jean Perrin, dirigé par M. Brahim Khelifa, Professeur des Universités.

Collaborations

Collaborations nationales avec M. El Marssi, maître de Conférences en physique au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (L.P.M.C.) et avec M^{me} Stasik, maître de Conférences en chimie organique au Laboratoire des Glucides à l'Université de Picardie Jules Verne à Amiens.

Collaboration internationale avec M. Rousseau, Professeur des Universités au Département de Nutrition à l'Université Ryerson de Toronto, Canada.

Expertises

Expert pour le compte du *Conseil Scientifique du Septentrion* (La Ligue contre le cancer, comités de l'Aisne, du Nord, du Pas-de-Calais et de la Somme) dans le cadre d'examen de dossiers de demande de subvention de recherche.

2 Synthèse des activités de recherche

2.1 Présentation et situation du thème de recherche

Mon travail de thèse portait sur une étude en spectroscopie Raman d'une famille d'esters du cholestérol : les cholestéryl alkanoates. Nous avons montré en faisant varier la longueur de la chaîne alkyle (n) et la température que le mode d'élongation du groupement charnière $O=C-O$ était un marqueur physico-chimique de la phase et des contraintes géométriques exercées sur les molécules. Nous avons mis en évidence le cas particulier du cholestéryl acétate ($n=2$) pour lequel l'étude en spectroscopie Raman a contredit les résultats déjà existants en diffraction par rayons X. Après la thèse, nous avons tout d'abord orienté notre travail sur une vérification complémentaire de nos résultats concernant le cholestéryl acétate en procédant à une modélisation numérique semi-empirique quantique. Cette étude a permis de confirmer nos conclusions et d'expliquer les différences d'interprétation entre les résultats obtenus en diffraction par rayons X et ceux observés en spectroscopie Raman lors de nos expériences.

Dans les différentes références utilisées dans mon travail de thèse, on pouvait y lire l'importance des esters du cholestérol dans la genèse de l'athérosclérose. Cette remarque me suggéra d'en savoir plus sur cette maladie. Après des recherches bibliographiques approfondies, j'ai découvert qu'à l'origine du processus athéromateux, on trouvait une accumulation de lipoprotéines LDL dans la paroi artérielle. L'accumulation de LDL dans l'intima des grosses artères est probablement le résultat d'un déséquilibre entre l'entrée et la sortie des LDL au niveau de la paroi artérielle. Le transport de la partie du cholestérol des LDL entre les tissus s'effectue à travers la paroi artérielle par des sites de liaison de LDL. Ce sont ces sites de liaison qui vont conditionner l'équilibre entre l'entrée et la sortie des LDL. Ces sites de liaison se décomposent environ en deux groupes : les récepteurs spécifiques et les récepteurs « scavenger ». Le nombre de récepteurs spécifiques des LDL est régulé suivant le besoin cellulaire de cholestérol, donc il n'intervient pas dans le déséquilibre. Le récepteur « scavenger » (éboueur) reconnaît des LDL qui ont subi une modification oxydative au niveau de l'apoprotéine apoB-100. Mais à l'inverse du récepteur spécifique des LDL, il n'est pas régulé. Une des causes du déséquilibre pourrait être alors l'accumulation de LDL oxydées dans la paroi artérielle. Aussi, j'entrepris d'étudier en spectroscopie Raman les LDL et les LDL oxydées. Mais, avant d'interpréter des spectres Raman de LDL qui pouvaient être en première approche compliqués vu la dimension de cette biomolécule et le nombre important d'éléments différents la composant, j'ai opté pour une étude séparée de différents constituants des LDL en spectroscopie Raman. C'est ainsi que j'ai mis en évidence le rôle déterminant des doubles liaisons $O=C$ et $C=C$ dans l'interprétation des spectres Raman des cholestéryl linoléate et arachidonate, en faisant de ces deux doubles liaisons des marqueurs physico-chimiques de tous premiers plans. Par une étude en spectroscopie Raman de 5 triglycérides monoacides saturés en fonction de la température, j'ai pu montrer également l'importance du mode d'élongation du groupement $O=C-O$ et des $C-H$ dans la détermination de la forme polymorphique de chaque triglycéride. À partir de ces résultats, je suis passé à l'étude proprement dite des LDL et des LDL oxydées en spectroscopie Raman, en phase isotrope liquide à température ambiante. De cette étude, j'ai pu mettre en lumière 5 marqueurs physico-chimiques des modifications oxydatives des LDL.

Afin de me procurer des LDL et des LDL oxydées de très bonne qualité, j'avais pris contact avec M. J.C. Mazière, Professeur des universités de biochimie du laboratoire de Biochimie, INSERM, de l'Université de Picardie Jules Verne. Il avait accepté de collaborer avec moi sur l'étude des LDL et LDL oxydées par spectroscopie Raman. Quelques mois plus tard, cette collaboration déboucha sur mon intégration dans son laboratoire, avec comme

tâche de diriger les recherches concernant la calcification de cellules musculaires lisses intervenant dans l'athérosclérose par une étude protéomique (SELDI-TOF) (Ce spectromètre de masse venait juste d'être acheté par l'Hôpital Nord d'Amiens dans le but de procéder à des études en protéomique clinique). C'est avec enthousiasme que je me suis attelé à cette nouvelle recherche entouré par une équipe de techniciens très performants. Après une mise en route difficile, nous avons pu obtenir des premiers résultats très significatifs qui ont débouché sur la détermination de plusieurs marqueurs biochimiques de discrimination entre des cellules musculaires lisses calcifiées et non calcifiées.

2.2 Résumé du travail de thèse : « Étude vibrationnelle d'une famille d'esters du cholestérol : les cholestéryl alkanoates »

Nous présentons sur la Fig.1 une représentation schématique d'un ester du cholestérol : le cholestéryl hexanoate.

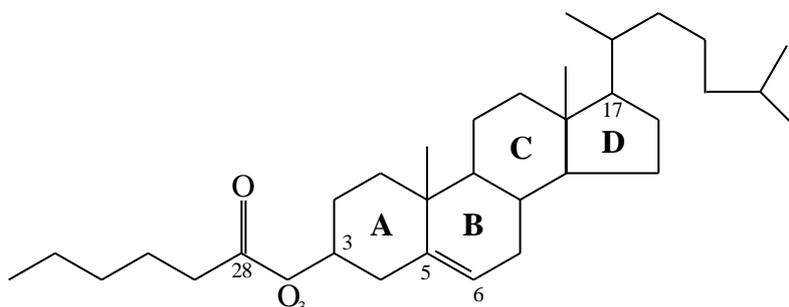


Figure 1. Exemple d'ester du cholestérol : le cholestéryl hexanoate appartenant à la famille des cholestéryl alkanoates.

Par une étude conformationnelle des cholestéryl alkanoates, nous avons émis l'hypothèse que le groupement charnière $O=C-O$ reflétait les contraintes exercées sur la molécule. Nous avons alors étudié l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur le comportement vibrationnel de la double liaison $O=C$. Nous présentons en Fig.2 les spectres Raman de dix cholestéryl alkanoates dans la zone spectrale du mode de vibration de la double liaison $O=C$.

Pour les cholestéryl alkanoates possédant une "réelle" chaîne alkyle ($n > 2$), l'étude du comportement vibrationnel de la double liaison $C=O$ en phase cristalline a mis en évidence un premier résultat : l'existence de deux types de molécules (A) et (B) qui ont la même configuration à l'intérieur de la maille élémentaire cristalline, et qui se différencient simplement par des détails de conformation. Ce résultat confirme les études réalisées par Craven sur ces cholestéryl alkanoates, en utilisant la diffraction par rayons X [1-3]. Le fait que le comportement vibrationnel ne soit pas le même pour tous les cholestéryl alkanoates étudiés a constitué le deuxième résultat de notre étude en phase cristalline. En effet, nous avons observé trois comportements vibrationnels différents de cette double liaison suivant les cholestéryl alkanoates : un pic large centré sur 1738 cm^{-1} , deux pics bien résolus centrés sur 1731 cm^{-1} et deux pics bien résolus centrés sur 1741 cm^{-1} . Ainsi, nous avons pu départager les cholestéryl alkanoates étudiés suivant trois groupes $n = 5,7,8,9$, $n = 11,12$ et $n = 14,18,22$ [4,5]. Cette classification est en accord avec celle déterminée par Barnard [6] en diffraction par rayons X. Grâce à la technique Raman, nous avons pu aller plus loin et expliquer le comportement vibrationnel de la double liaison $C=O$ par l'action de deux facteurs : la masse de la chaîne alkyle et la disposition des molécules dans la maille élémentaire cristalline. Nous avons alors montré que pour $n = 5,7,8,9$, l'effet de la masse de la chaîne alkyle était prédominant, alors que pour $n = 11,12,14,18,22$ les contraintes exercées par la structure cristalline sur la double liaison $C=O$ l'emportaient [5].

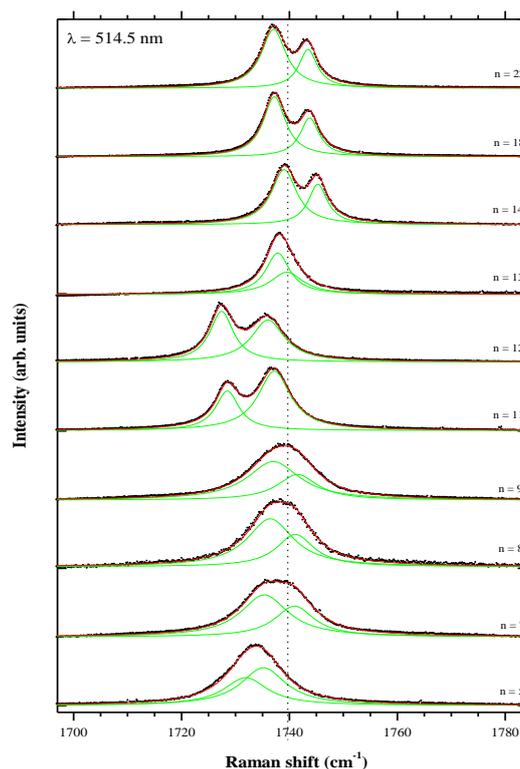


Figure 2. Spectres Raman de dix cholestéryl alkanoates en phase polycristalline à température ambiante. On observe deux types de comportements pour le mode de la double liaison C=O : un doublet bien résolu pour $n = 11, 12, 14, 18, 22$ ou un doublet non résolu pour $n = 5, 7, 8, 9, 13$.

À la différence de ce qui se passe en phase cristalline, notre étude en phases faiblement ordonnées des cholestéryl alkanoates, possédant une “réelle” chaîne alkyle, a démontré que la longueur de la chaîne alkyle n’a pratiquement pas d’influence sur le comportement vibrationnel de la double liaison C=O. Tous les échantillons étudiés ont le même spectre Raman dans la zone spectrale 1700 - 1800 cm^{-1} : un pic centré sur 1739 cm^{-1} . Seule la largeur à mi-hauteur de ce pic permet de reconnaître la phase isotrope liquide des mésophases. Mais nous n’avons pas pu séparer la phase smectique de la phase cholestérique, par la technique Raman, ce qui constitue une limite dans la perspective d’applications.

Nous avons également obtenu des résultats nouveaux sur le cholestéryl acétate ($n = 2$) [7]. Contre toute attente, nous avons établi que le comportement vibrationnel de ce matériau en phase cristalline se singularise par rapport à celui des cholestéryl alkanoates étudiés précédemment ($n > 2$) : au lieu d’observer deux composantes pour le mode vibrationnel de la double liaison C=O, nous en avons décelé quatre (voir Fig.3). Notre étude du cholestéryl acétate en phases faiblement ordonnées révèle que l’existence de ces quatre composantes s’explique par une structure cristalline particulière : la maille élémentaire se compose de deux molécules de configurations différentes, qui se découpent elles-mêmes chacune en deux molécules (A) et (B) se différenciant simplement par des détails de conformation.

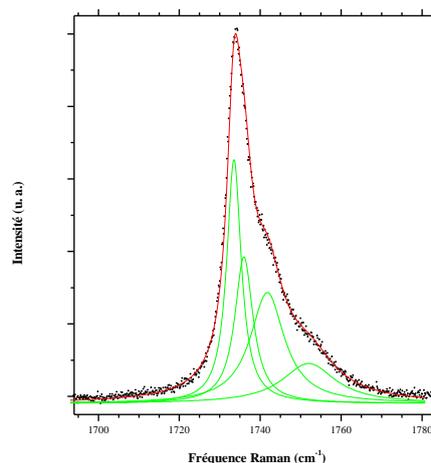


Figure n°3. Spectre Raman du cholestérylyl acétate avec les quatre lorentziennes correspondant aux quatre fréquences de vibration du mode de la double liaison C=O ; longueur d'onde d'excitation utilisé $\lambda = 514.5$ nm. On constate un pic avec trois épaulement.

Ainsi, par un simple spectre Raman d'un cholestérylyl alkanoate, dans la zone où se trouve le mode vibrationnel de la double liaison C=O, nous pouvons prédire les caractéristiques générale de sa structure cristalline, ce qui en fait un marqueur physico-chimique de tout premier plan.

2.3 Recherches effectuées après la thèse

2.3.1 Détermination de marqueurs physico-chimique de molécules biologiques intervenant dans l'athérosclérose par spectroscopie Raman.

Étude du cas du cholestérylyl acétate par une modélisation numérique

Nous avons observé lors de nos travaux en thèse que le mode de vibration de la double liaison C=O (pour $n = 2$) possédait 4 composantes en phase cristalline et deux en phase isotrope liquide. Ce résultat était en contradiction avec les résultats de Craven [3,8-10] obtenus en diffraction par rayons X puisque celui-ci avait déterminé deux molécules (A) et (B), en phase cristalline dans une même maille élémentaire, qui se différenciaient par des longueurs et des angles de liaison différents. Afin de valider nos conclusions, nous avons entrepris une étude en modélisation numérique par un calcul semi-empirique quantique avec la méthode AM1 (Austin Model 1) Hamiltonien. Nous avons alors établi 9 configurations possibles pour le cholestérylyl acetate et nous avons procédé au calcul de l'énergie moléculaire de chaque configuration considérée comme isolée [11]. Parmi les 9 configurations, deux d'entre elles présentaient le même minimum d'énergie moléculaire : les configurations notées Conf. II et Conf. VII. Ces deux configurations se différenciaient essentiellement par la position du cycle A de la molécule : pour la Conf. II, le cycle A était en position bateau alors que pour la Conf. VII il était en position chaise. Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux obtenus en spectroscopie Raman pour le cholestérylyl acétate en phase isotrope liquide : deux composantes pour le mode de vibration la double liaison C=O correspondant aux différences d'angle de liaison $O_{28}=C_{28}-O_3-C_3-C_4$ entre les deux configurations modélisées numériquement.

En comparant nos résultats numériques et ceux obtenus par Craven en diffraction par rayon X, on s'est aperçu que la configuration observée par Craven était la Conf. VII calculée par nos

soins. Nous avons alors émis l'hypothèse que, lors de l'expérience en spectroscopie Raman, nous transformions sous l'effet de la puissance du Laser incident certaines molécules qui étaient en Conf. VII au départ en des molécules placées dans la Conf. II. Pour cela, nous avons imaginé un chemin réactionnel qui nous permettrait de passer de la Conf. VII à la Conf. II et nous avons estimé alors l'énergie d'activation de cette réaction par une nouvelle modélisation numérique afin de la comparer à l'énergie fournie par le laser incident. Pour passer de la Conf. VII à la Conf. II, nous avons défini une configuration intermédiaire pour le cholestéryl acétate notée New Conf. qui correspondait à une assemblage des deux configurations II et VII. L'énergie moléculaire de la New Conf. s'est avérée encore plus basse que celle obtenue pour les Conf. II et Conf. VII, ce qui conférait à cette configuration intermédiaire une meilleure stabilité.

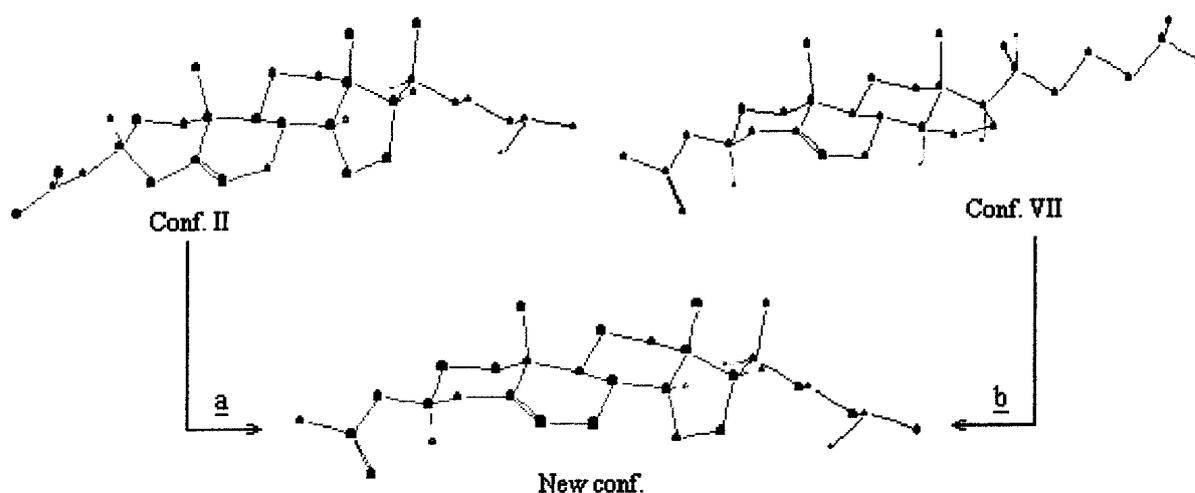


Figure n°4. Chemins réactionnels décrivant le passage du cholestéryl acétate de la Conf. VII à la Conf. II par l'intermédiaire de la New Conf.

Pour obtenir l'énergie d'activation de la réaction correspondant au passage de la configuration intermédiaire à la configuration II, il a été nécessaire d'opérer une substitution radicalaire sur le carbone C₃ du cycle A de la molécule. L'énergie d'activation a alors été estimée à 41,8 kcal mol⁻¹. Le passage de la Conf. VII à la New Conf. s'est avéré plus compliqué : il a fallu entreprendre 3 substitutions radicalaires avec une rotation du groupement iso-octyl de la molécule de cholestéryl acétate. La valeur de l'énergie d'activation pour ce passage a donc plus élevé : 69,1 kcal mol⁻¹.

Au total pour passer de la Conf. VII à la Conf. II, l'énergie totale d'activation a été évaluée à $\Delta E^\ddagger = 110,9$ kcal mol⁻¹. Or, lors de nos expériences en Raman, la puissance du Laser incident était de 150 mW durant 800s, soit une énergie $\Delta E_0 = 120J$. Sachant que la densité du cholestéryl acétate est égal à 3,21 et que le faisceau lumineux est focalisé sur l'échantillon par un microscope avec un volume d'étude de 1 μm^3 , nous avons pu estimer le nombre de mole à $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol, soit une énergie d'activation égale à $\Delta E^\ddagger = 0,2 J$. Par conséquent, comme $\Delta E_0 \gg \Delta E^\ddagger$, il est clair que l'énergie du Laser incident induit bien le passage des molécules de la Conf. VII à la Conf. II, ce qui explique alors le fait que nous observons deux composantes pour le mode de vibration de la double liaison C=O dans la phase isotrope liquide et 4 composantes dans la phase cristalline puisque dans la maille élémentaire la

superposition des molécules impose que les molécules dans la Conf. VII se décomposent en deux molécules (A_1) et (B_1) se différenciant uniquement par des longueurs et des angles de liaison, ainsi que pour celles dans la Conf. II (molécules (A_2) et (B_2)).

Étude en spectroscopie Raman des cholestéryl linoléate et arachidonate

Afin de faciliter l'assignement des modes vibrationnels des LDL et des LDL oxydées en spectroscopie Raman, nous avons étudié auparavant trois éléments composants les LDL : les cholestéryl linoléate, arachidonate et les triglycérides. Je vais tout d'abord exposer les résultats que j'ai obtenus sur les cholestéryl linoléate et arachidonate par une étude en spectroscopie Raman [12]. Les cholestéryl linoléate et arachidonate se distinguent respectivement des cholestéryl octadécanoate (stéarate, $n = 18$) et eicosanoate (arachidate, $n = 20$) par deux doubles liaisons C=C sur la chaîne alkyle ($C_{36}=C_{37}$ et $C_{39}=C_{40}$) pour le cholestéryl linoléate et par trois doubles liaisons C=C sur la chaîne alkyle ($C_{32}=C_{33}$, $C_{35}=C_{36}$ et $C_{38}=C_{39}$) pour le cholestéryl arachidonate. Le premier résultat important que nous avons obtenu concerne le rôle de la double liaison C=O : elle continue de rester un marqueur physico-chimique de la phase et des contraintes géométriques exercées sur la molécule. En effet, dans la zone spectrale $1800-1600\text{ cm}^{-1}$, le mode de vibration de la double liaison C=O du cholestéryl linoléate possède deux composantes en phase polycristalline et seulement une composante en phase isotrope liquide (Voir Fig. 5).

Lors de notre étude en Raman, nous avons découvert un nouveau marqueur physico-chimique de ces molécules : la double liaison C=C. Le mode de vibration de la double liaison C=C diffère de manière importante entre les cholestéryl linoléate et arachidonate. Pour s'en convaincre, nous montrons sur la Fig. 6 leurs spectres Raman en phase isotrope liquide dans la zone spectrale $1800-1600\text{ cm}^{-1}$.

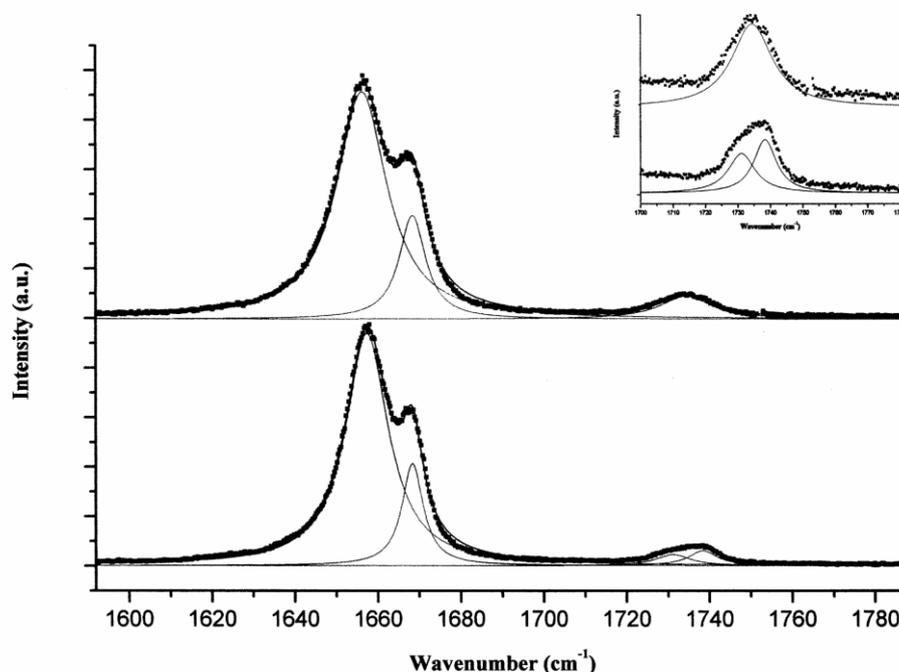


Figure 8

Figure n°5. Spectres Raman des cholestéryl linoléate dans la zone spectrale $1800-1600\text{ cm}^{-1}$ en phase isotrope liquide et en phase polycristalline. On observe 2 composantes pour le mode vibration de la double liaison C=O en phase polycristalline alors qu'il n'en existe qu'une en phase isotrope liquide.

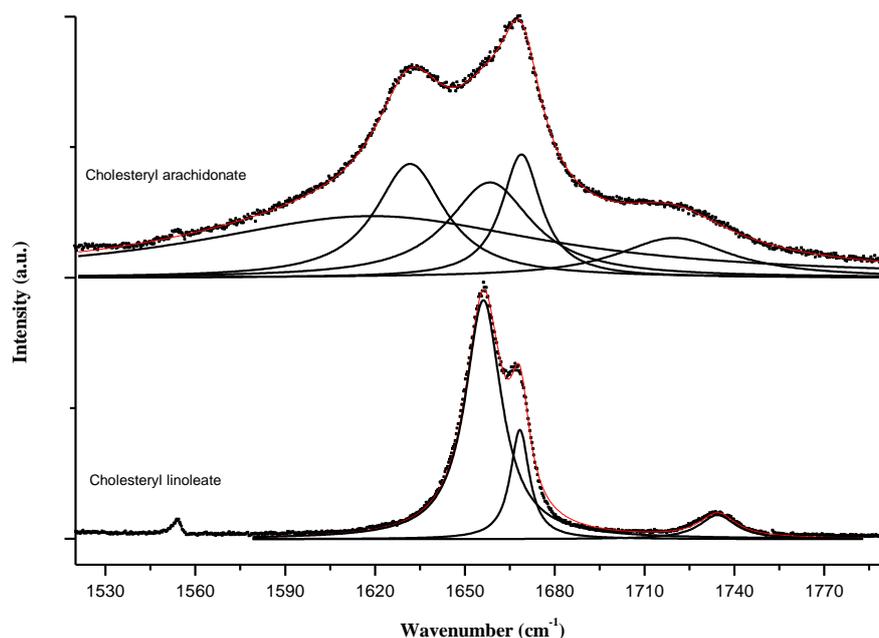


Figure n°6. Spectres Raman des cholestéryllinoléate et arachidonate dans la zone spectrale 1800-1600 cm^{-1} en phase isotrope liquide. On observe 4 composantes pour le mode vibration de la double liaison C=C pour le cholestéryllinoléate alors qu'il n'en existe que deux pour le cholestéryllinoléate.

Pour le cholestéryllinoléate, il existe deux groupes de double liaison C=C : celles localisées dans la chaîne alkyle et celle se trouvant dans le stéroïde (c'est-à-dire dans les cycles). Ces groupes ne ressentiront pas les mêmes contraintes géométriques exercées par la molécule sur ces liaisons (la chaîne alkyle est plus flexible alors que le stéroïde est plus figé). Il n'est donc pas étonnant de trouver deux modes de vibration pour la double liaison C=C. Par contre, il est plus étonnant de trouver une différence de comportement vibrationnel entre les cholestéryllinoléate et arachidonate car ils ont en commun ces deux groupes de double liaison C=C. En réalité, dans le cas du cholestéryllinoléate, un autre phénomène va apparaître : la conjugaison de deux doubles liaisons C=C voisines qui va créer un mode d'élongation particulier lié aux liaisons C=C—C—C=C [13]. Or, il existe dans la molécule 3 groupes différents de C=C—C—C=C ($\text{C}_{32}=\text{C}_{33}-\text{C}_{34}-\text{C}_{35}=\text{C}_{36}$, $\text{C}_{35}=\text{C}_{36}-\text{C}_{37}-\text{C}_{38}=\text{C}_{39}$ et $\text{C}_{38}=\text{C}_{39}-\text{C}_{40}-\text{C}_{41}=\text{C}_{42}$). Les quatre composantes observées pour le cholestéryllinoléate correspondent alors au mode d'élongation de la double liaison C=C à l'intérieur du stéroïde, aux trois modes d'élongation des 3 groupes différents de C=C—C—C=C. Aussi, le comportement vibrationnel de la double liaison C=C est bien ici un marqueur physico-chimique de discrimination entre les cholestéryllinoléate et arachidonate.

Étude en spectroscopie Raman des triglycérides monoacides saturés

Les triglycérides caractérisent l'une des plus importantes classes de lipides. Ils interviennent dans la plupart des acides présents dans l'alimentation, la pharmacologie et la cosmétique. Dans cette étude, nous allons nous limiter aux triglycérides monoacides saturés ayant comme formule développée $\text{C}_{3+3n}\text{H}_{2+6n}\text{O}_6$ où $n-1$ est le nombre de carbone de la chaîne

alkyle. Ces triglycériles présentent des formes polymorphiques en phase cristalline qui dépendent entre autre de la longueur de la chaîne alkyle. Pour les triglycériles que nous avons étudiés ($n = 9, 11, 12, 14$ et 16), il existe trois formes polymorphiques différentes notées (α , β' et β), avec différents points de fusion [14-16].

Nous avons tout d'abord procédé à une étude en spectroscopie Raman à température ambiante, puis nous avons fait varier la température afin d'observer les changements éventuels de formes polymorphiques pour un même triglycérile [17,18]. À température ambiante, puis en faisant varier la température, nous avons observé que le mode vibrationnel de la double liaison C=O était une fois de plus un marqueur de la structure de molécule. En effet, le mode d'élongation de la double liaison C=O suivant la valeur de n se décompose soit en deux composantes soit en trois composantes (Voir Fig. 7).

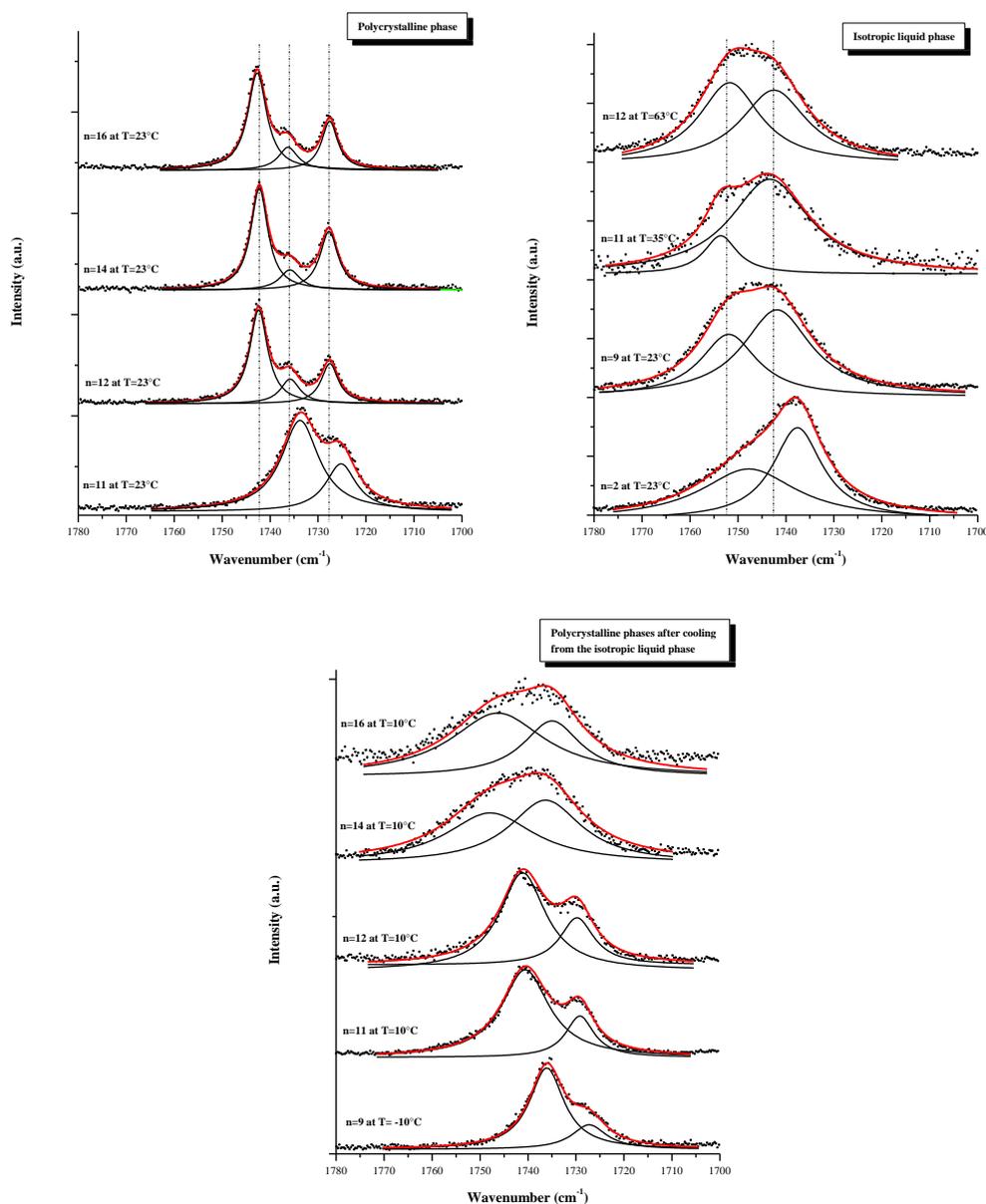


Figure n°7. Spectres Raman du mode d'élongation de la double liaison C=O pour le tripalmitin ($n = 16$), trimyristin ($n = 14$), trilaurin ($n = 12$), triundecanin ($n = 11$) en phase polycristalline à température ambiante, puis pour le tripelargonin ($n = 9$) et $n = 11, 12, 14, 16$ en phase polycristalline après refroidissement à partir de la phase isotrope liquide et enfin pour le triacétin ($n = 2$) et $n = 9, 11, 12$ en phase isotrope liquide.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus en diffraction en rayons X, on se rend compte que le nombre de composante du mode d'élongation permet de distinguer la forme polymorphique α de la forme β mais pas de différencier la forme β' de β . On observe deux composantes pour le mode d'élongation de la double liaison C=O dans la forme α et trois dans les formes β' et β . Pour différencier les trois en même temps, nous avons alors étudié les modes d'élongation des C-H dans la zone spectrale 3000-2800 cm^{-1} . On a montré que le rapport d'intensité $I(2845)/I(2880)$ était un marqueur de formes polymorphiques pour les triglycérides monoacides saturés (Voir Tableau. 1 et Fig. 8). En effet, en phase polycristalline, on montre par comparaison avec les résultats de Simpson que le tripalmitin et le trimyristin sont cristallisés suivant la forme β alors que le trilaurin à température ambiante se trouve en forme β' . En ce qui concerne le triundecanin, il semble qu'il soit sous la forme α à $T = 23^\circ\text{C}$. En phase polycristalline après refroidissement, les 5 triglycérides étudiés semblent tous être sous la forme α . Ceci va dans le même sens que l'étude des spectres Raman de ces échantillons dans la zone spectrale de la double liaison C=O : un doublet plus ou moins résolu pour le mode vibrationnel de la C=O. Il a noté que la valeur du rapport d'intensité $I(2845)/I(2880)$ est plus élevée que dans le cas des résultats de Simpson pour la même forme α . Cette différence pourrait venir du type de cristallisation des molécules dans la maille élémentaire. En effet, dans la maille élémentaire cristalline, les triglycérides peuvent se disposer sur une longueur équivalente au double de la longueur de la chaîne alkyle ou au triple de cette longueur.

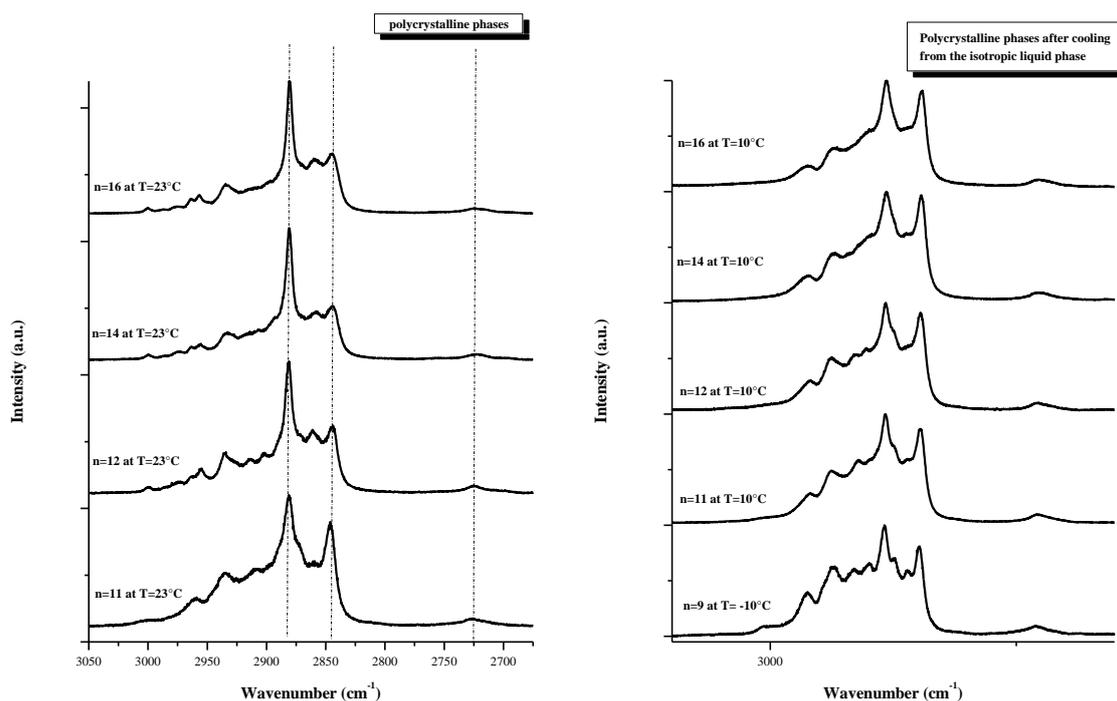


Figure n°8. Spectres Raman du mode d'élongation des liaison C—H pour le tripalmitin ($n = 16$), trimyristin ($n = 14$), trilaurin ($n = 12$), triundecanin ($n = 11$) en phase polycristalline à température ambiante, puis pour le tripelargonin ($n = 9$) et $n = 11, 12, 14, 16$ en phase polycristalline après refroidissement à partir de la phase isotrope liquide.

Tableau 1

Polycristalline T = 23°C	I(2845)/I(2880)			
Tripalmitin (n=16)	0.46			
Trimyristin (n=14)	0.42			
Trilaurin (n=12)	0.52			
Triundecanin (n=11)	0.80			
Polycristalline après refroidissement	I(2845)/I(2880)			
Tripalmitin (n=16) T = 10°C	0.90			
Trimyristin (n=14) T = 10°C	0.93			
Trilaurin (n=12) T = 10°C	0.91			
Triundecanin (n=11) T = 10°C	0.87			
Tripelargonin (n=9) T = -10°C	0.81			
Simpson, 1983	β form	β_1' form	β_2' form	α form
Tristearin (n=18)	0.45	0.54	0.62	0.69

Étude en spectroscopie Raman des LDL et des LDL oxydées

Dans la théorie oxydative de l'athérosclérose, les liaisons athéromateuses sont initiées par l'oxydation de lipoprotéines LDL. Des investigations en spectroscopie Raman et infrarouge ont été entreprises sur des échantillons de malades humaines [19-24]. Dans chaque cas, il s'agissait de tissus humains provenant de lésions présentes à l'intérieur de l'intima des aortes. Dans ce type d'échantillons, on ne retrouve pas que des LDL et des LDL oxydées. Aussi, pour notre étude en spectroscopie Raman, nous nous sommes intéressés uniquement aux LDL et aux LDL oxydées afin de pouvoir identifier par une étude vibrationnelle des marqueurs possibles des modifications oxydatives des LDL. Les LDL natives que nous avons récupérées pour nos expériences proviennent d'un mélange de plasma sanguin des membres du laboratoire [25]. L'oxydation des LDL a été faite in vitro à partir d'une incubation avec des ions cuivre dans les LDL natives. Les spectres Raman ont été obtenus durant les 30 premières minutes d'expérimentation, à température ambiante. Sur la Fig. 9 (voir page suivante), nous montrons les spectres Raman comparés entre les LDL et les LDL oxydées dans trois zones spectrales : 1200 - 700 cm^{-1} , 1800 - 1250 cm^{-1} et 2750 - 2200 cm^{-1} .

Dans les zones spectrales 1200 - 700 cm^{-1} et 1800 - 1250 cm^{-1} , on observe dans les LDL oxydées une disparition et/ou une diminution en intensité des pics correspondants au β -carotène (1518, 1156 et 1006 cm^{-1}) qui est un puissant anti-oxydant présent dans les LDL [21,24]. Nous voyons apparaître également de nouveaux modes vibrationnels pour les LDL : 1610, 1350 et 917 cm^{-1} .

Ces trois modes sont des témoins de l'oxydation des LDL : 917 cm^{-1} est assigné au mode d'élongation des liaisons P—O—C(OH) (oxydation des phospholipides), 1610 et 1350 cm^{-1} sont assignés respectivement au mode d'élongation de la double liaison C=O (amide) et au mode de flexion (bending) O—H liés à l'oxydation des groupements acides aminés de l'apoB-100 [13]. Dans la zone 2750 - 2200 cm^{-1} , on observe entre les spectres Raman des LDL et des LDL oxydées la disparition des modes d'élongation des liaisons S—H dans la zone 2600 - 2400 cm^{-1} , et l'apparition d'un pic à 2440 cm^{-1} assigné au mode d'élongation O—H du groupe P—O—C(OH) lié à l'oxydation des phospholipides [26]. La disparition du mode vibrationnel des liaisons S—H au cours de l'oxydation s'explique par le fait que lors de l'oxydation les liaisons S—H sont rompues pour donner naissance à des ponts disulfures S—S qui ont des modes de vibration dans la zone des 500 cm^{-1} (pour les observer en Raman, il

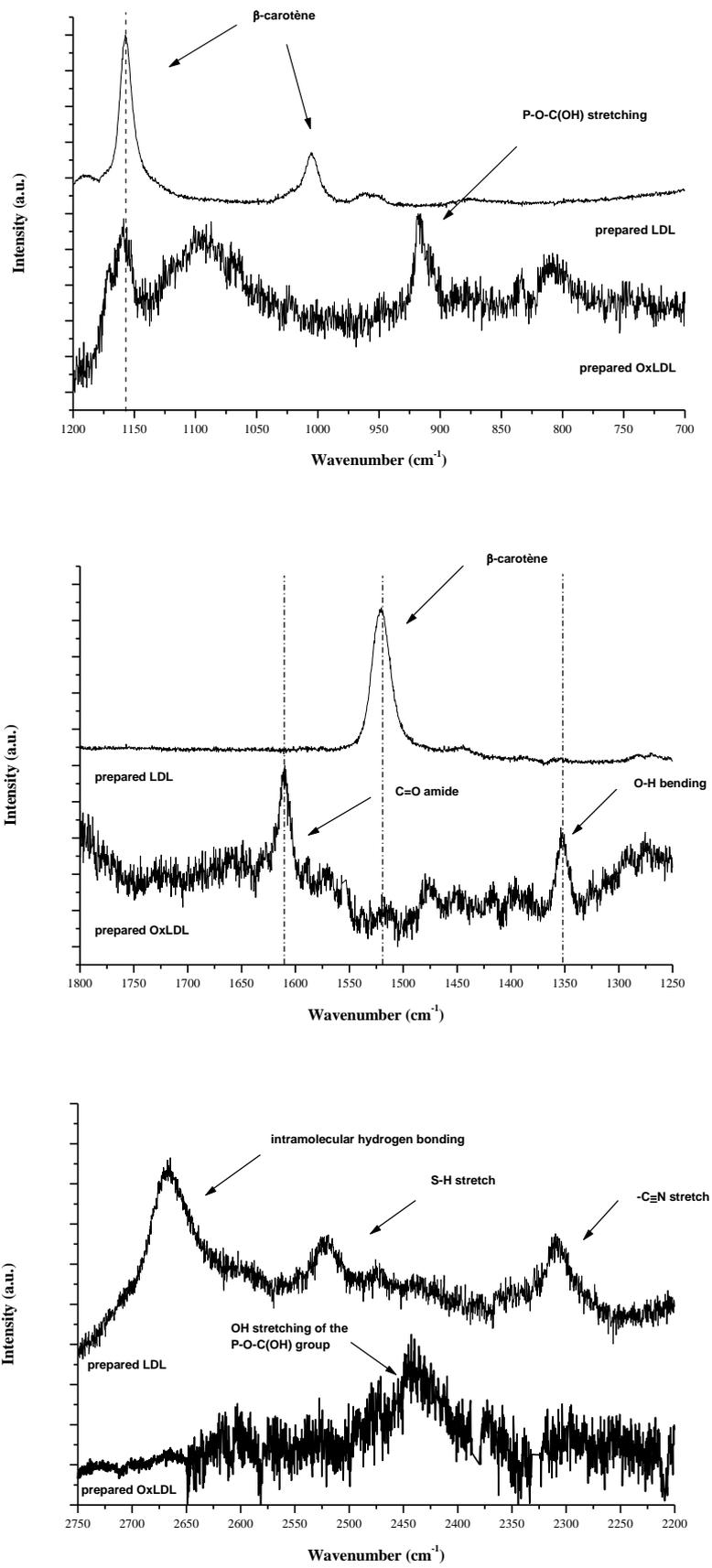


Figure n°9. Spectres Raman comparés des LDL et des LDL oxydées dans les zones spectrales : 1200 - 700 cm⁻¹, 1800 - 1250 cm⁻¹ et 2750 - 2200 cm⁻¹, à température ambiante.

faudrait utiliser d'autres conditions expérimentales). Ainsi, par cette étude en spectroscopie Raman, nous avons pu mettre en lumière 5 marqueurs physico-chimiques des modifications oxydatives des LDL.

Que ce soit pour les cholestéryl alkanoates, les triglycérides ou les lipoprotéines LDL, nos études en spectroscopie Raman nous ont permis de déterminer différents marqueurs physico-chimiques de ces matériaux. Cette technique expérimentale non destructive est donc un atout dans ce type de travail. Une étude en fonction de degré d'oxydation des LDL est en cours afin d'évaluer l'importance de ces marqueurs dans les modifications oxydatives.

2.3.2 Détermination de marqueurs biochimique par une étude protéomique (SELDI-TOF) de la différenciation des cellules musculaires lisses A7r5 en « osteoblast-like cells ».

Les calcifications artérielles sont, par définition, des dépôts des sels de calcium (principalement phosphate de calcium, ou hydroxyapatite), qui apparaissent progressivement dans la paroi des gros vaisseaux (artères), modifiant la structure et les propriétés mécaniques des ces derniers. Selon la localisation principale du dépôt calcique, ces calcifications s'inscriront dans la cadre de « l'artériosclérose », ou de « l'athérosclérose ».

L'artériosclérose [27-30] est une pathologie dont le caractère principal est la calcification de la « media » (zone intermédiaire) de la paroi artérielle. Dans ce cas, le processus de calcification constitue l'essentiel de la pathologie, autrement dit l'artériosclérose est l'apparition progressive de calcifications au sein de la media. La conséquence principale en est une perte des propriétés élastiques de l'artère. Dans l'athérosclérose, au contraire, la calcification concerne essentiellement l'intima (partie de la paroi au contact du flux sanguin) du vaisseau. Elle n'est pas le principal élément de la pathologie athéromateuse, mais accompagne les stades les plus tardifs de cette maladie, et peut contribuer aux complications aiguës (fractionnement de la plaque, accidents cardiovasculaires obstructifs aigus, de type infarctus, parfois mortels).

On peut dire que l'artériosclérose et l'athérosclérose sont deux processus pathologiques très souvent intimement liés et parfois indissociables car représentant deux aspects du vieillissement artériel, bien que leur « histoire naturelle » soit fondamentalement différente. Toutefois, au stade ultime de l'athérosclérose (« plaque compliquée »), ils coexistent et présentent une caractéristique commune : *la calcification de la paroi vasculaire*, même si cette calcification concerne des compartiments différents : l'intima pour l'athérosclérose, la media pour l'artériosclérose. C'est à cette caractéristique commune, c'est-à-dire, au sens large, à *la calcification artérielle*, que nous nous intéresserons.

Il semble qu'en fait la calcification artérielle soit le résultat d'une *transformation phénotypique des cellules musculaires lisses* (de l'intima ou de la media), *qui acquièrent un phénotype ostéoblastique* (« osteoblast-like cells » : OLC) *leur permettant de sécréter les éléments de la matrice extracellulaire nécessaires à la calcification et de promouvoir cette dernière, comme le font les ostéoblastes au sein du tissu osseux*. Cette « transdifférenciation » aboutit à ce que l'on pourrait qualifier de « calcification ectopique » (en dehors du tissu « naturel » : le tissu osseux). Ce processus est induit par différents facteurs accompagnant certaines situations pathologiques. L'hypothèse du rôle de la transdifférenciation des cellules musculaires lisses dans la genèse des calcifications vasculaires est actuellement étayée par de nombreux travaux [31-34]. Toutefois, les mécanismes et les facteurs impliqués dans cette transformation phénotypique des cellules musculaires lisses en OLC ne sont pas encore tous identifiés ni compris.

Parmi les modèles *in vitro*, donc assez aisément et rapidement étudiables, de la transdifférenciation des cellules musculaires lisses en culture, celui de la lignée de cellules musculaires lisses artérielles de rat A7r5 est l'un des plus « praticables ». Des études réalisées dans le laboratoire (ERI 12) ont en particulier montré que, sous l'effet d'une concentration élevée de phosphate inorganique, ces cellules changent de morphotype, entrent en apoptose, et génèrent de larges plages minéralisées (phosphate de calcium). Cet effet est dose-dépendant (en fonction de la concentration en phosphate). Il apparaît en général après 5 à 7 jours de culture en présence d'une concentration en phosphate de 4 mM (NB : la concentration sérique

normale, chez l'homme, est de l'ordre de 1,4 mM). La minéralisation peut être mise en évidence par diverses méthodes, la plus courante étant la coloration de Von Kossa, au nitrate d'argent [35].

La Figure 10, ci-après, illustre le processus de minéralisation, révélé par la coloration de von Kossa, dans une culture de cellules A7r5 exposées à une concentration élevée de phosphate inorganique (Pi).

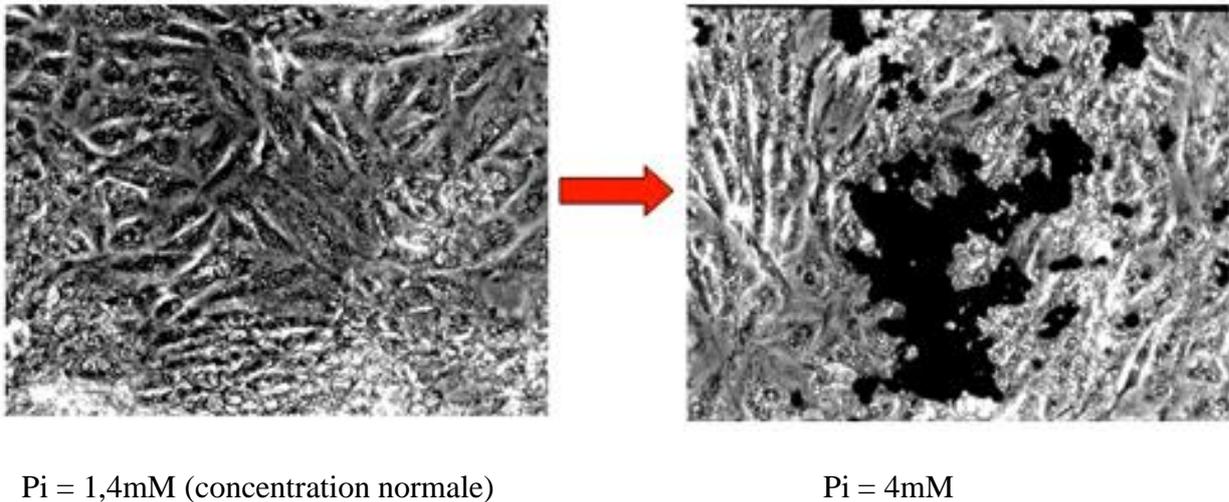


Figure 10. Cellules A7r5 cultivées pendant 9 jours soit en présence d'une concentration normale (1,4 mM) de phosphate inorganique (Pi), à gauche, ou bien en présence de 4 mM de Pi, à droite. On observe très bien les plages de calcification (en noir dense), lacunaires, révélées par la technique au nitrate d'argent de Von Kossa. La flèche rouge symbolise la transdifférenciation des cellules musculaires lisses (à gauche), en cellules de type « ostéoblast-like », minéralisantes, à droite (photos obtenues au laboratoire, J.C.Mazière et al., ERI-12, CHU d'Amiens).

Le but de notre travail a donc été d'étudier la faisabilité d'une approche protéomique par SELDI-TOF de la transdifférenciation des cellules musculaires lisses A7r5 en culture, sous l'effet d'un promoteur de différenciation et de minéralisation, le phosphate inorganique (Il n'existe aucune autre étude de ce genre dans la littérature scientifique).

Une étude protéomique est une approche consistant à obtenir la « carte » des protéines présentes dans un échantillon biologique (tissu, sérum, urine etc...). Dans un premier temps, au lieu de chercher à mettre en évidence le protéome (ensemble des protéines exprimées par un type cellulaire donné dans des conditions données) dans son entier, on va chercher à mettre en évidence *les protéines les plus discriminantes entre les deux situations étudiées* (ex : sujets normaux / sujets porteurs d'une tumeur de tel type). Si l'on en trouve (une ou plusieurs, cas le plus fréquent) et si elles apparaissent, ou subissent des modifications quantitatives positives ou négatives, on dira que l'on a identifié des *marqueurs biologiques* de la situation étudiée. Des algorithmes combinant les variations de plusieurs marqueurs ainsi identifiés permettent d'augmenter la significativité des différences observées.

Il s'agit donc d'une approche *orientée* de la situation étudiée. Il est à noter que dans cette technique, il n'y a pas d'étape d'hydrolyse préalable : On « lance » dans le spectromètre de masse un mélange de protéines intactes. Le résultat obtenu ne permet pas, dans un premier temps, de connaître précisément la nature des protéines. On pourra aussi parler d'un « *profil*

protéique », mettant simplement en évidence un certain nombre de « pics » discriminant une situation d'une autre. Il reste donc ensuite à *identifier ces pics*, ce que l'on pourra faire, après purification et préparation quantitative (ex : chromatographie sur colonne) par des techniques de spectrométrie de masse classiques. On part donc un peu « à l'aveugle », avec des étapes initiales de mise au point permettant de définir le profil le plus discriminant.

La **technique utilisée** est la méthode de détection **SELDI-TOF** (Surface Enhanced Laser Desorption / Ionization – Time Of Flight) (Matériel CIPHERGEN). Les protéines sont soumises à une chromatographie d'adsorption sur une barrette dite « Protein Chip ». Chaque barrette comporte 8 champs circulaires. Chaque champ, dont on peut décider de la nature (ex : polaire, apolaire, anionique, cationique etc..) est en fait une « mini-colonne » de chromatographie d'adsorption, caractérisée par la nature de son support, qui va retenir plus ou moins tel ou tel type de protéine, en fonction de l'affinité de cette dernière pour le support. Telle ou telle « famille » de protéines (famille caractérisée par exemple par son degré d'hydrophobicité, ou son caractère anionique ..) sera préférentiellement retenue par le support. Pour chaque type de support, on obtiendra donc un « profil protéique » comparatif entre le témoin et la condition expérimentale choisie. C'est toute l'importance de cette première étape que de définir les conditions (en fait les types de « chips ») les plus discriminants pour mettre en évidence les différences les plus significatives entre les situations comparées. Cette étape préliminaire, en fait capitale, est celle de la réflexion et du choix des meilleures conditions d'analyse. Elle peut être longue, mais une fois les conditions déterminées, les analyses ultérieures seront beaucoup plus rapides.

Les protéines retenues par le « chip » sont ensuite décollées et ionisées sous l'action d'un faisceau laser. Les ions sont accélérés classiquement par l'action d'un champ électrique vers un détecteur (Fig. 11). Le temps de vol dans le tube sera alors proportionnel à la masse de la protéine. L'équation de proportionnalité est la suivante :

$$\frac{M/Z}{U} = a(t - t_0)^2 + b$$

où M représente la masse en Da, Z la charge, t le temps en seconde et U , a , t_0 et b les paramètres de calibration de l'appareil. On obtient alors un spectre de masse de l'échantillon obtenu dans des conditions expérimentales particulières.

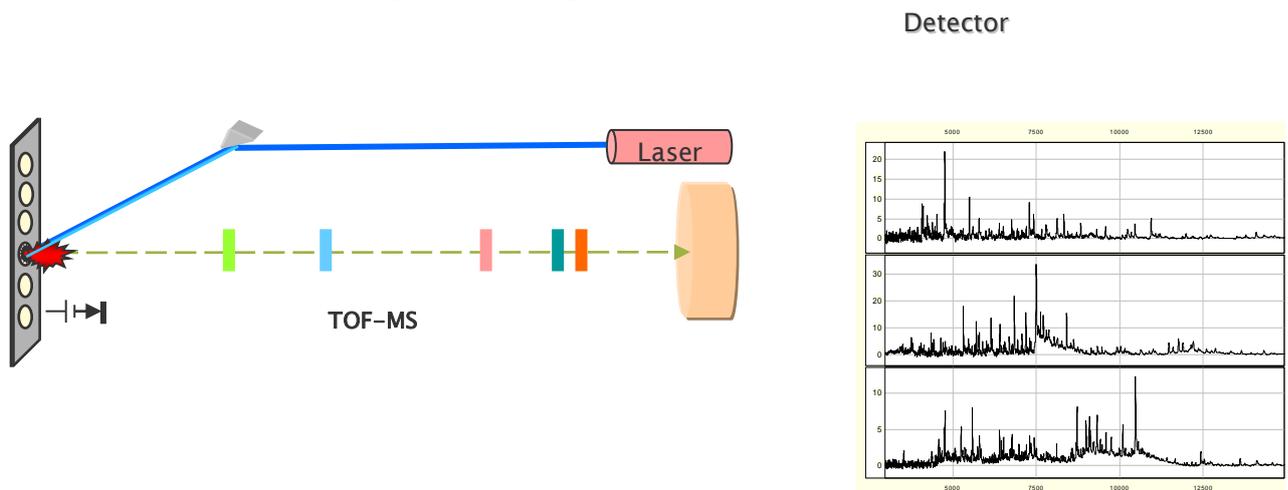


Figure 11 . Principe de détection des protéines décollées de la barrette de rétention chromatographique (« chip ») par un tir laser. Selon le type de surface, on obtiendra des profils différents. Certains seront discriminants, d'autres non. On choisira ensuite les

conditions les plus discriminantes. *NB : il est possible d'effectuer un grand nombre de « tirs » par barrettes, en changeant les coordonnées de la surface ciblée.*

Avant d'arriver au choix du protocole expérimental le mieux adapté à notre recherche de protéines de discrimination entre les cellules non traitées et traitées par le phosphate inorganique, nous avons testé différents paramètres : le type de barrette, la quantité de produit à mettre sur chaque spot, le type de tampon de lavage, de rétention et le tampon d'extraction des protéines pour nos échantillons de cellules musculaires lisses A7r5.

Nous avons d'abord testé la quantité de produit sur deux barrettes différentes CM10 et Q10 avec comme tampon d'extraction Urée + CHAPS + DTT (dithiothreitol). Nous avons remarqué qu'avec 5 ou 10 µg de produit par spot nous avons des pics avec des intensités suffisantes. Cependant, nous n'observons pas ou presque pas de protéines sur nos spectres (c'est-à-dire des masses supérieures à 15 000 Da). Nous avons décidé de changer le tampon d'extraction et nous avons utilisé le tampon suivant : Western – EDTA+anti-protéase. Nous avons alors remarqué que les protéines étaient plus nombreuses en utilisant la barrette Q10 qu'avec la CM10 et que le nombre de pics dans les régions des petites masses (inférieures à 15 000 Da) avait baissé de manière significative. À partir de ce tampon d'extraction, nous avons fait varier le type de barrette : CM10, Q10, H50, IMAC30 Cu et IMAC30 Zn en prenant toujours comme matrice la SPA (puisque l'on voulait faire du profiling) et dans le même temps le type de tampon de rétention. On s'est alors aperçu que les barrettes H50, IMAC30 Cu et IMAC30 Zn étaient très sélectives, donc qu'elles étaient peu adaptées à une recherche de protéines sur une grande gamme de masse (4 000 à 150 000 Da). Nous avons donc décidé de nous limiter aux barrettes CM10 et Q10. Au niveau des tampons de rétention, les plus pertinents pour la CM10 semblaient être le TRIS à pH7 et le sodium d'acétate à pH5 ; et pour la Q10 le TRIS à pH7 et à pH9.

En fonction des études préalables réalisées, nous avons décidé de choisir les **conditions expérimentales** suivantes :

Type de barrette :

- Barrette CM10, échangeuse de cations.
- Barrette Q10, échangeuse d'anions.

Tampon de Lavage et rétention :

- 100 mM Tris à pH 7

Matrice :

- SPA (sinapinic acid), utilisée à 50%

Échantillon :

- 10 µg par spot de cellules musculaires lisses A7r5 avec comme tampon d'extraction (Western – EDTA+anti-protéase)

Procédure expérimentale :

- Une barrette se compose de 8 spots. On dispose ici 1 échantillon de cellules A7r5 par spot. Chaque échantillon provient d'une culture différente, mais de la même souche. Soit au total par exemple 4 barrettes pour l'étude des J+3:

Ainsi, avec 16 spots différents par type de barrette, on peut faire une étude statistique fiable à partir de clusters obtenus par le logiciel de calcul de CIPHERGEN. Ce logiciel permet de détecter des pics suffisamment intenses (paramètres à définir lors de la détection) et d'obtenir leurs caractéristiques intrinsèques (valeurs de l'intensité, de la largeur du pic, du rapport signal/bruit etc). Il donne aussi la valeur de l'intensité moyenne d'un pic qui apparaît dans les 8 échantillons. On peut aussi opérer à des calculs statistiques pour tester le caractère

discriminant de chaque pic. Pour savoir si un pic est discriminant entre celui observé pour les cellules témoins et celui pour les cellules phosphatées, on peut valider ou non une hypothèse à partir du calcul de la π -value. L'hypothèse formulée ici est la suivante : le pic a-t-il le même comportement entre les cellules témoins et phosphatées ? Si la π -value est proche de 1 alors l'hypothèse est vérifiée. Si par contre elle a une valeur très faible, nous sommes en présence d'un pic discriminant.

Les **cellules de la lignée A7r5** sont des cellules musculaires lisses provenant de prélèvement de fragment d'aorte thoracique embryonnaire de rat DB1X (Kimes & Brandt, 1976). Elles ont été obtenues à partir de l'American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1444). Leur aspect en phase exponentielle de croissance est de type fibroblastique.

Les **conditions de culture** (multiplication des cellules en vue d'expérimentations) sont les suivantes :

- Les cellules sont maintenues en flacons de 75 cm² (TPP, 90076) en étuve humidifiée, sous atmosphère à 5% de CO₂, en milieu DMEM (Dulbecco Modified Essential Medium) à 4.5 mg.mL⁻¹ de glucose, additionné de 1 % de glutamine, 1 % d'antibiotique et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), qui fournit entre autre les facteurs de croissance nécessaires à la multiplication cellulaire. Les cellules sont « repiquées » deux fois par semaine, c'est à dire décollées par une solution de trypsine / EDTA, comptées à la cellule de Malassez, puis réensemencées après une dilution d'un facteur trois.

- En ce qui concerne la minéralisation induite par le phosphate, les expériences sont conduites en plaques de 24 puits (Falcon), en milieu DMEM supplémenté avec 5% de SVF et du phosphate monosodique à des concentrations variant de 1,4 mM (concentration normale dans les sérums humains) à 4 mM (concentration pouvant être observée dans le sérum de sujets insuffisant rénaux).

- L'ensemencement est réalisé à une densité de 7000 cellules / cm², puis, après confluence (en pratique 48h après l'ensemencement), exposées au milieu enrichi en phosphate. La minéralisation est étudiée en fonction du temps. Ici, nous nous intéresserons à J+2 (+2 jours après l'ensemencement) , J+3, J+4, J+5, J+6 et J+7 après le passage en milieu enrichi en phosphate.

Sur la Fig. 12 (page suivante), on peut voir l'évolution du taux de protéines récupérées en fonction du nombre de jours après l'enrichissement en phosphate inorganique pour les cellules témoins ou cultivées en milieu enrichi en phosphate.

Nous pouvons constater que pour J+2, J+3 et J+4, le taux de protéines récupérées reste pratiquement constant, que ce soit pour les cellules traitées ou les cellules non traitées. À J+5 et J+6, on observe une très nette diminution du taux de protéines pour les cellules exposées au phosphate 4mM. La décroissance est beaucoup plus marquée. Enfin, à J+11, la diminution est considérable pour les cellules cultivées en présence de phosphate à 4 mM. La différenciation des cellules A7r5 s'est accompagnée d'un processus d'apoptose, libérant des plages intercellulaires au sein desquelles sont secrétés et déposés les éléments nécessaires à la minéralisation (collagène, ostéopontine, ostéocalcine, sialoprotéine osseuse, glycosaminoglycannes etc..). C'est au niveau de ces plages d'apoptose qu'apparaissent les dépôts minéralisés.

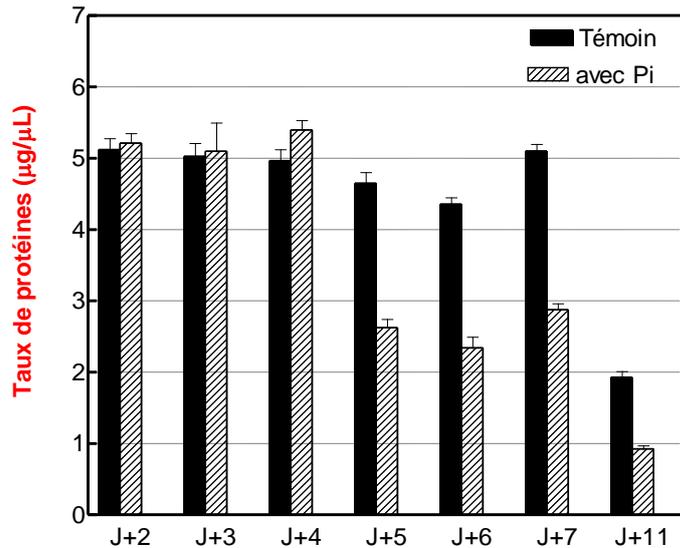


Figure 12 . Évolution du taux de protéines après extraction en fonction du nombre de jours après l'enrichissement en phosphate inorganique pour les cellules témoins ou traitées (Pi = 4mM).

Avant de procéder à une analyse statistique de nos résultats, nous sommes assurés de la **reproductibilité de nos expériences**. Nous présentons donc sur les Figs. 13, 14, 15 et 16 les spectres de masse de nos échantillons avec la barrette CM10 petites masses pour les échantillons témoins à J+5, la barrette Q10 petites masses pour les échantillons phosphatés à J+3, la barrette CM10 grandes masses pour les échantillons témoins à J+7 et la barrette Q10 grandes masses pour les échantillons phosphatés à J+5.

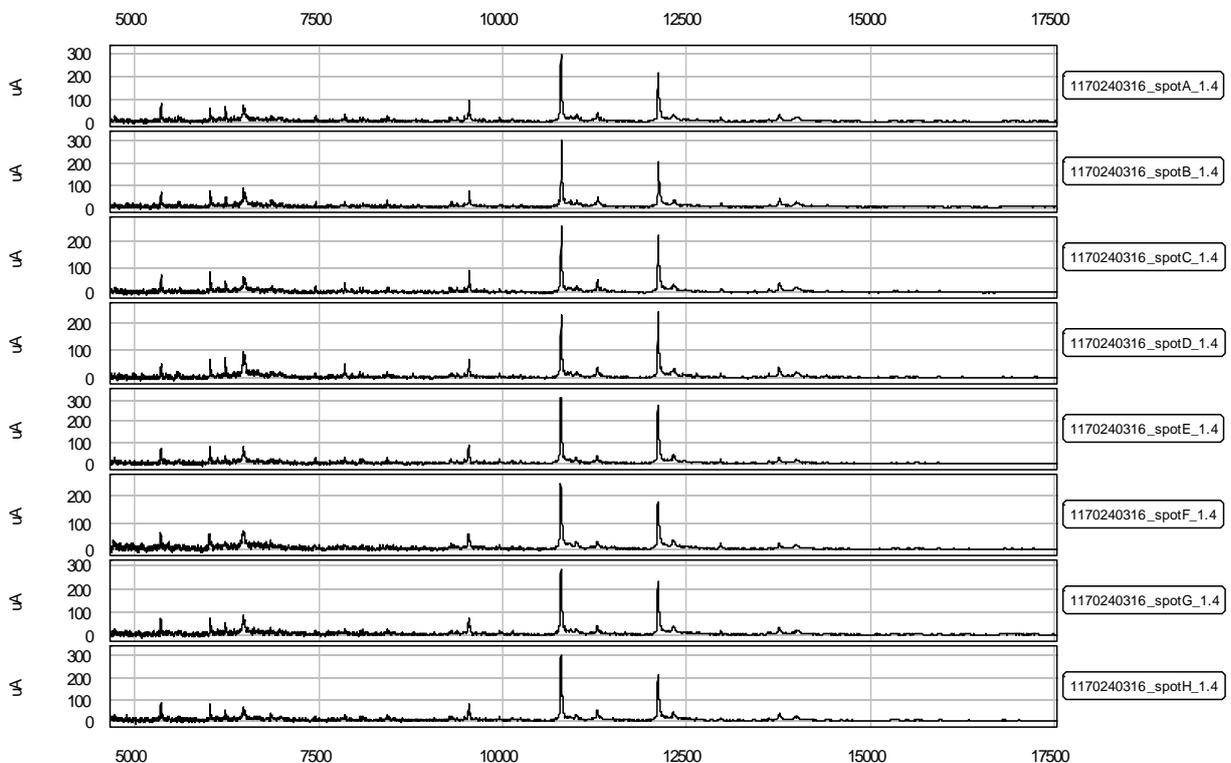


Figure n°13. Spectres de masse de cellules musculaires lisses A7r5 témoin à J+5 par la méthode protéomique SELDI-TOF avec la barrette CM10 petites masses (pm).

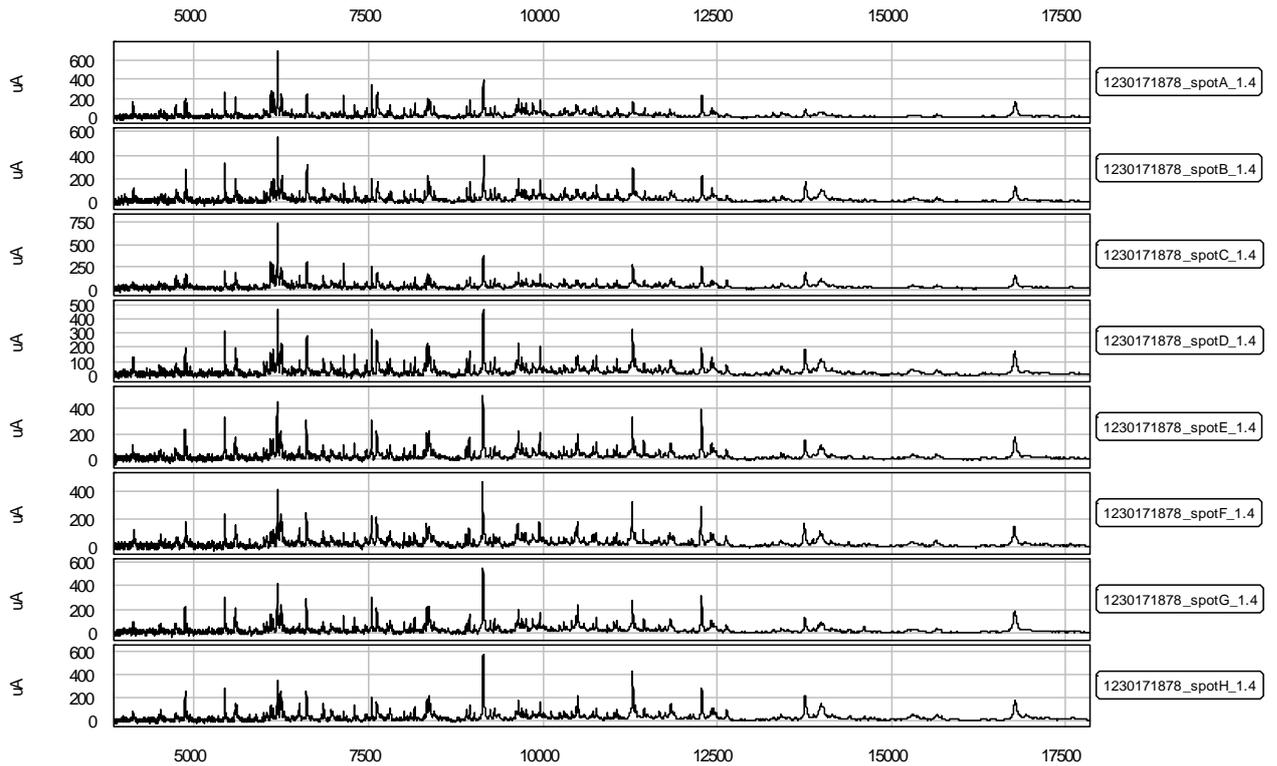


Figure n°14. Spectres de masse de cellules musculaires lisses A7r5 phosphatés à J+3 par la méthode protéomique SELDI-TOF avec la barrette Q10 petites masses (pm).

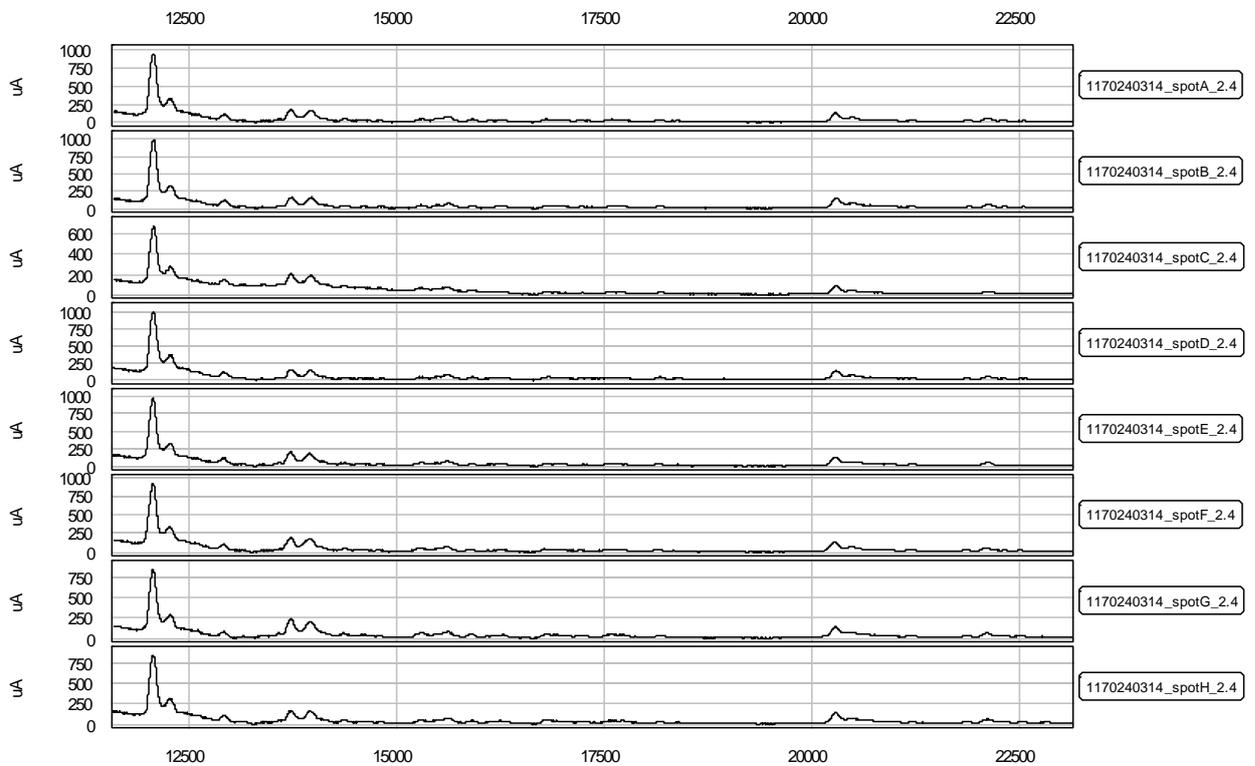


Figure n°15. Spectres de masse de cellules musculaires lisses A7r5 témoins à J+7 par la méthode protéomique SELDI-TOF avec la barrette CM10 grandes masses (gm).

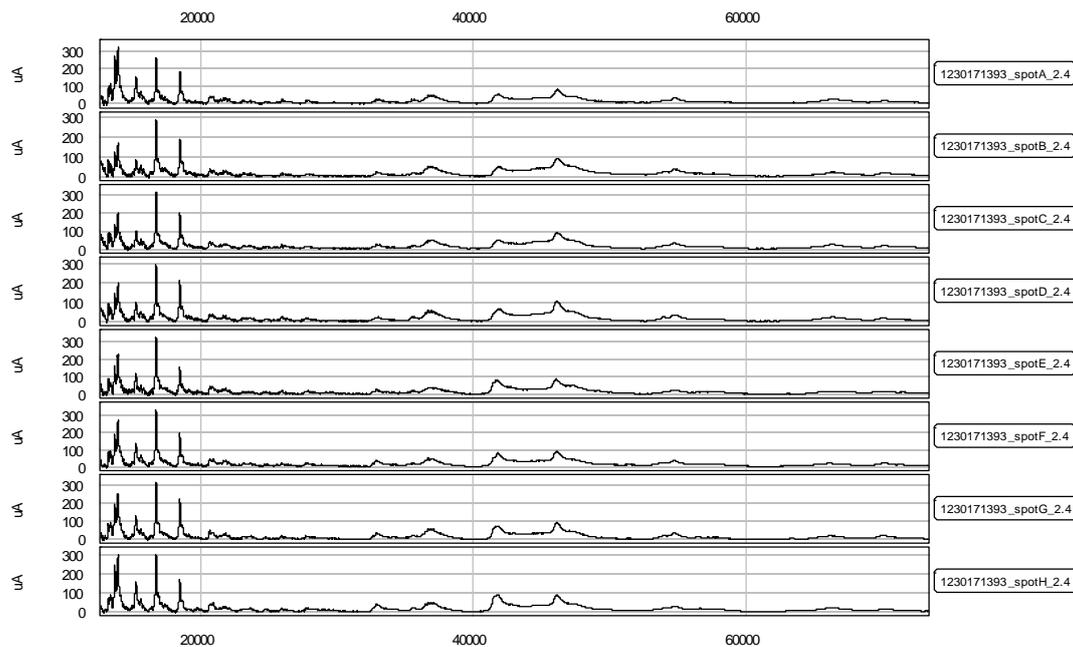


Figure n°16. Spectres de masse de cellules musculaires lisses A7r5 phosphatés à J+5 par la méthode protéomique SELDI-TOF avec la barrette Q10 grandes masses (gm).

Nous observons bien à partir de ces spectres qu'entre les 8 spots d'une même barrette nous retrouvons les mêmes profils : d'où la reproductibilité de nos expériences. On remarque aussi qu'il existe d'une part plus de pics pour une barrette Q10 comparativement à la barrette CM10 en petite masse et en grande masse. D'autre part, on constate que l'on accroche plus de protéines avec la Q10 qu'avec la CM10 (échelle de la masse par charge de 20000 à 80000 Da/Z pour Q10 gm alors que pour la CM10 gm on n'accroche véritablement des protéines que jusqu'à 25000 Da/Z).

Pour la détermination des pics de différenciation par une méthode statistique, le logiciel de calcul numérique Biomarker Wizard de CIPHERGEN nous permet directement d'obtenir les pics détectés sur un spectre. Pour pouvoir comparer entre les échantillons traités et non traités, nous avons procédé au préalable à une normalisation et à un alignement des spectres. Nous avons pris pour chaque spectre les mêmes paramètres de calculs numériques. Ce traitement nous a permis de déterminer les pics communs au type d'échantillon (cellules non traitées et cellules phosphatées) et ce pour tous les jours d'observation (J+2 à J+7). Nous récapitulons les résultats dans le tableau 2 suivant :

Tableau 2. Synthèse des résultats du traitement numérique
(pm = petite masse, gm = grande masse)

Type de barrette	CM10 pm	CM10 gm	Q10 pm	Q10 gm
Nombre de pics communs à J2, J3, J4, J5, J6 et J7	15	13	33	18
Nombre de pics discriminants (π -value < 0,001)	4	3	5	5

Comme on l'avait constaté sur les spectres lors de la reproductibilité, il semble que les peptides et les protéines soient mieux retenus sur la barrette Q10 que sur la barrette CM10 (surtout pour les cas des spectres petites masses 33 contre 15 pics pour la CM10). Les pics discriminants sont déterminés à partir de la valeur de la π -value calculée entre les échantillons témoins et phosphatés pour un même jour d'observation. Il existe donc 17 pics discriminants pour lesquels on peut étudier l'évolution suivant le jour d'observation. On peut les ranger dans trois catégories : les pics discriminants à évolution croissante suivant le temps (le rapport d'intensité entre le pic correspondant aux cellules phosphatées et celui du témoin croît en fonction des jours), à évolution décroissante et à évolution variable suivant le jour d'observation. Nous n'allons pas ici présenter la totalité de ces pics. On va se limiter aux 4 pics les plus pertinents : les pics discriminants à 9554 Da/Z avec CM10 pm, 12294 Da/Z avec Q10 pm, 20305 Da/Z avec CM10 gm, 24760 Da/Z avec CM10/Q10 gm.

Le pic à 9554 Da/Z avec CM10 pm

Nous présentons sur les figures 17 et 18 le récapitulatif des spectres centrés sur le pic 9554 Da/Z avec la barrette CM10 obtenus pour les échantillons témoins et les échantillons phosphatés par rapport au jour d'observation. Entre les deux figures, on constate une chute en intensité du pic correspondant à 9554 Da/Z à partir de J+5.

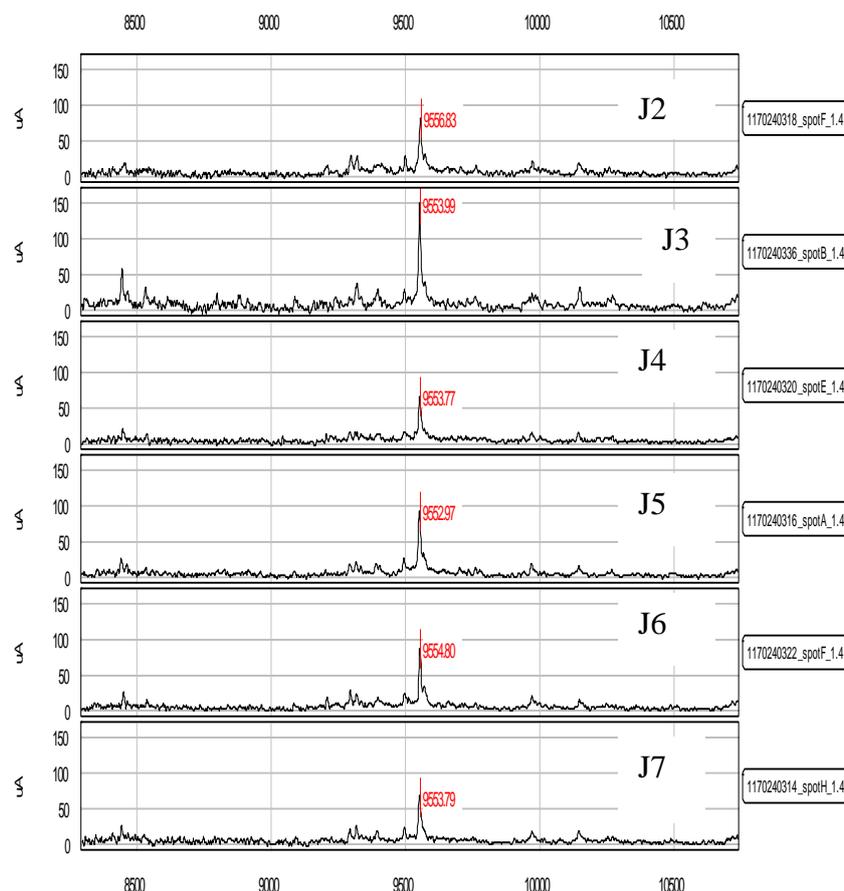


Figure 17. Spectres SELDI-TOF centrés sur le pic 9554 Da/Z avec la barrette CM10 pm obtenus pour les échantillons témoins observés à J+2, J+3, J+4, J+5, J+6 et J+7.

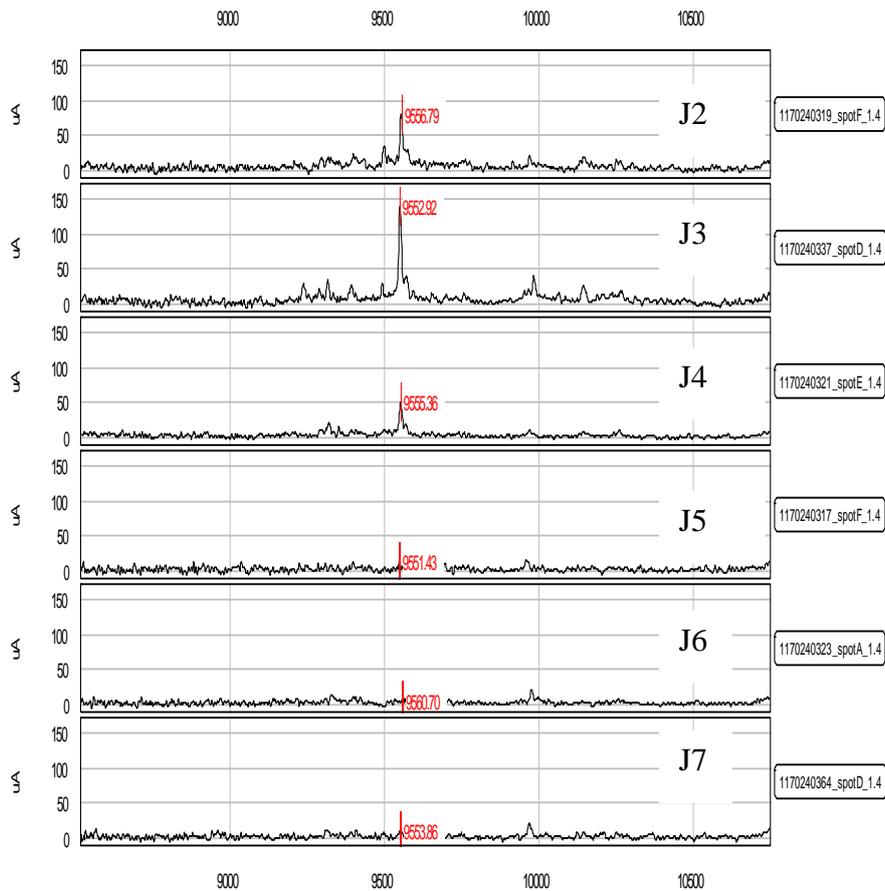


Figure 18. Spectres SELDI-TOF centrés sur le pic 9554 Da/Z avec la barrette CM10 pm obtenus pour les échantillons phosphatés observés à J+2, J+3, J+4, J+5, J+6 et J+7.

Ce phénomène est encore plus flagrant lorsque l'on effectue le rapport des intensités entre le pic de l'échantillon phosphaté et le pic témoin. L'évolution de ce rapport en fonction de temps est présentée sur la figure 19, les valeurs de π -value étant indiquées dans le tableau 3.

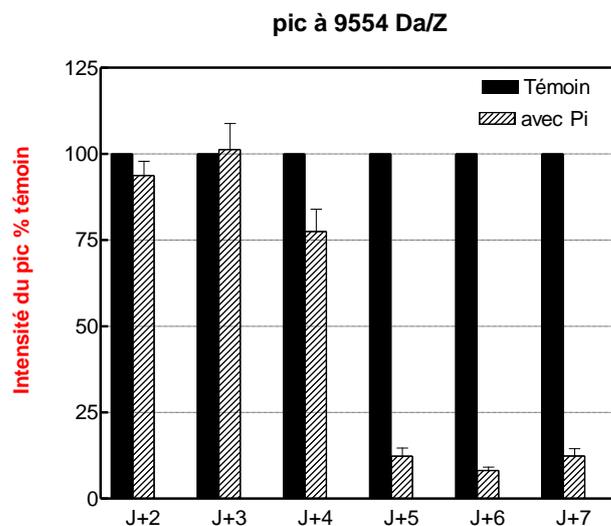


Figure n°19. Évolution du rapport d'intensité des pics discriminants 9554 Da/Z avec CM10 pm. On observe une forte décroissance de l'intensité du pic à partir de J+5.

Tableau 3. Valeurs des π -values obtenues par le logiciel Biomarker Wizard de CIPHERGEN pour le pic 9554 Da/Z en fonction des jours d'observation, CM10 pm

Pic 9554 Da/Z	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7
π -value	0,4008	0,6104	0,0209	0,0008	0,0008	0,0008

Le pic à 12294 Da/Z avec Q10 pm

Nous présentons sur les figures 20 et 21 le récapitulatif des spectres centrés sur le pic 12294 Da/Z avec la barrette Q10 obtenus pour les échantillons témoins et les échantillons phosphatés par rapport au jour d'observation.

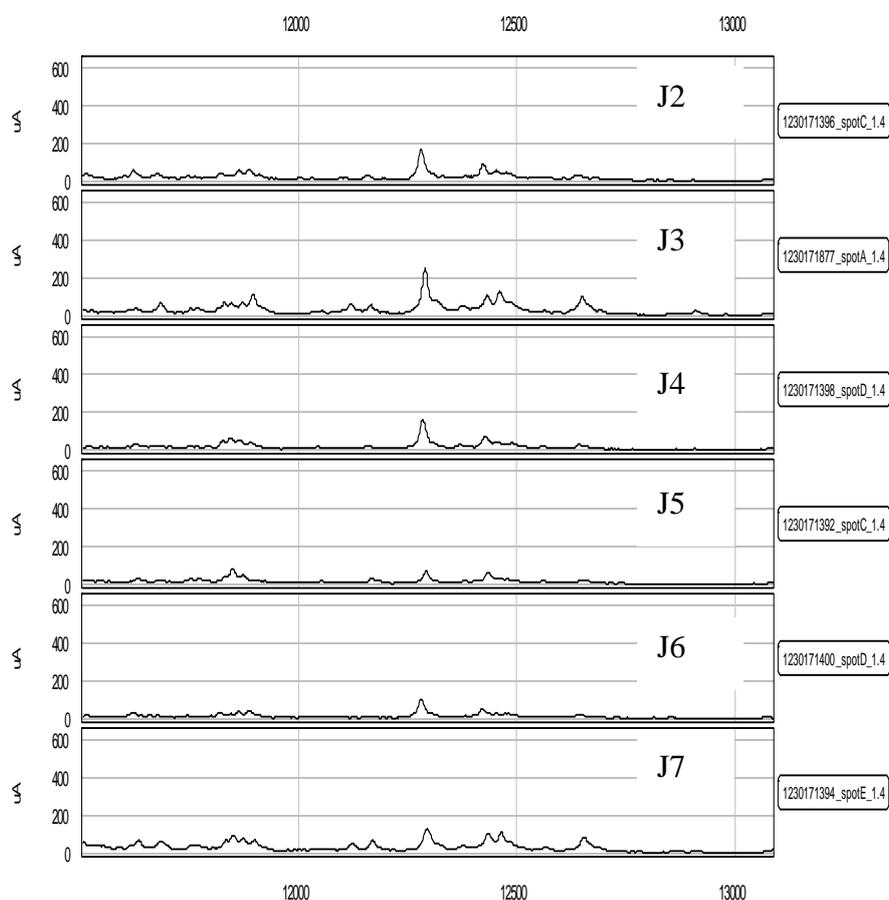


Figure 20. Spectres SELDI-TOF centrés sur le pic 12294 Da/Z avec la barrette Q10 obtenus pour les échantillons témoins observés à J+2, J+3, J+4, J+5, J+6 et J+7.

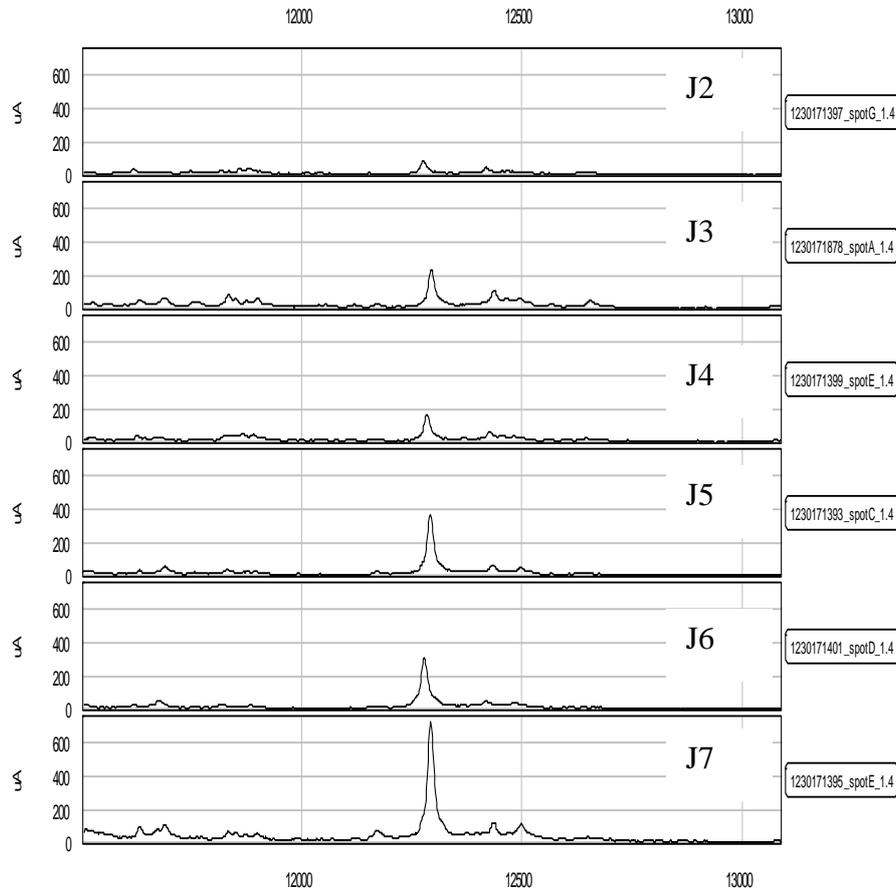


Figure 21 Spectres SELDI-TOF centrés sur le pic 12294 Da/Z avec la barrette Q10 obtenus pour les échantillons phosphatés observés à J+2, J+3, J+4, J+5, J+6 et J+7.

Entre les deux figures, on constate une forte croissance en intensité du pic correspondant à 12294 Da/Z à partir de J+5. Ce phénomène est encore plus flagrant lorsque l'on effectue le rapport des intensités entre le pic de l'échantillon phosphaté et le pic témoin. L'évolution de ce rapport en fonction de temps est présentée sur la figure 22 et les valeurs des π -values sont indiquées dans le tableau 4.

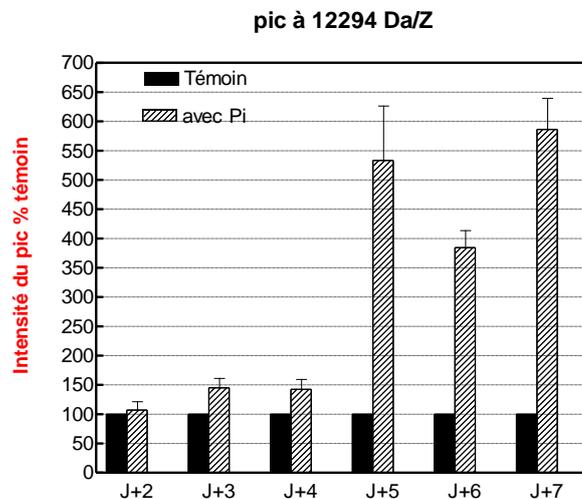


Figure n°22. Évolution du rapport d'intensité des pics discriminants 12294 Da/Z avec Q10 pm. On observe une forte croissance de l'intensité du pic à partir de J+5.

Tableau 4. Valeurs des π -values obtenues par le logiciel Biomarker Wizard de CIPHERGEN pour le pic 12294 Da/Z en fonction des jours d'observation, Q10 pm

Pic 12294 Da/Z	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7
π -value	0,8336	0,0372	0,0357	0,0008	0,0008	0,0008

Le pic à 20305 Da/Z avec Q10 gm

Nous présentons sur les figures 23 et 24 le récapitulatif des spectres centrés sur le pic 20305 Da/Z avec la barrette Q10 gm obtenus pour les échantillons témoins et les échantillons phosphatés par rapport au jour d'observation.

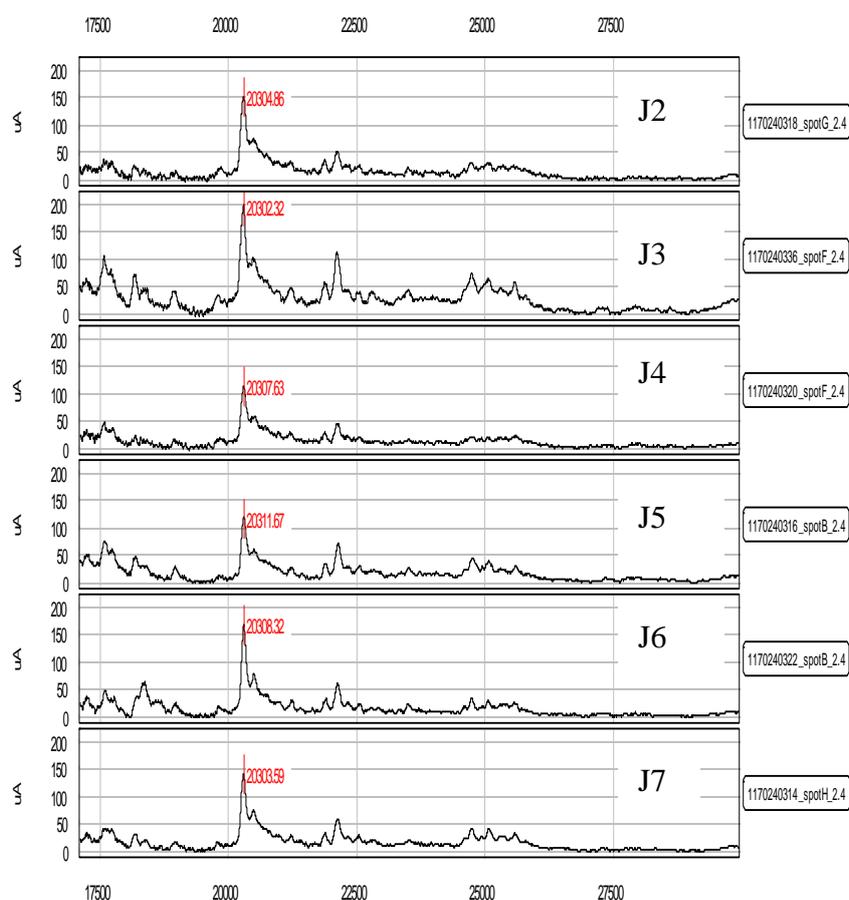


Figure 23. Spectres SELDI-TOF centrés sur le pic 20305 Da/Z avec la barrette Q10 gm obtenus pour les échantillons témoins observés à J+2, J+3, J+4, J+5, J+6 et J+7.

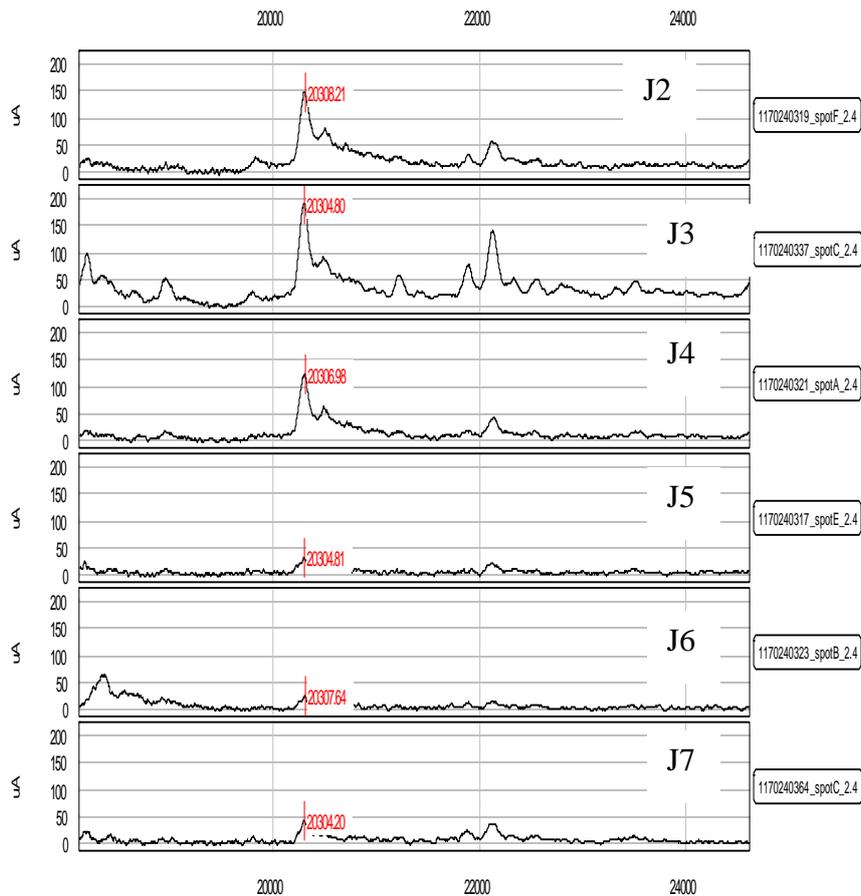


Figure 24. Spectres SELDI-TOF centrés sur le pic 20305 Da/Z avec la barrette Q10 gm obtenus pour les échantillons phosphatés observés à J+2, J+3, J+4, J+5, J+6 et J+7.

Entre les deux figures, on constate une forte décroissance en intensité du pic correspondant à 20305 Da/Z à partir de J+5. L'évolution du rapport des intensités entre le pic de l'échantillon phosphaté et le pic témoin en fonction de temps est présentée sur la figure 25 et les valeurs des π -values sont indiquées dans le tableau 5.

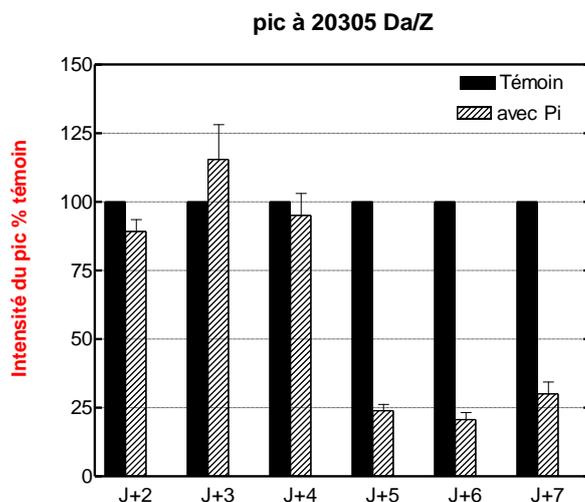


Figure n°25. Évolution du rapport d'intensité des pics discriminants 20305 Da/Z avec Q10 gm. On observe une forte décroissance de l'intensité du pic à partir de J+5.

Tableau 5. Valeurs des π -values obtenues par le logiciel Biomarker Wizard de CIPHERGEN pour le pic 20305 Da/Z en fonction des jours d'observation, CM10 gm

Pic 20305 Da/Z	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7
π -value	0,1722	0,2345	0,8336	0,0008	0,0008	0,0008

Ce pic est d'autant plus intéressant qu'il correspond à l'évolution d'une protéine voisine de la masse 20305 Da. La calcification a donc pour action de diminuer le nombre de cette protéine dans les cellules musculaires lisses à partir du 5^{ème} jour de culture.

Le pic à 24760Da/Z avec CM10 / Q10 gm

Nous avons observé la protéine à environ 24760 Da/Z avec les deux barrettes CM10 et Q10. C'est la seule dans ce cas. Il se trouve que ce pic est discriminant dans les deux cas. Au lieu de présenter les figures centrées sur ce pic pour les deux barrettes avec les cellules traitées et non traitées, on choisit de montrer sur les figures 26 et 27 le rapport d'intensité du pic entre les cellules témoins et phosphatées dans les deux cas de barrettes.

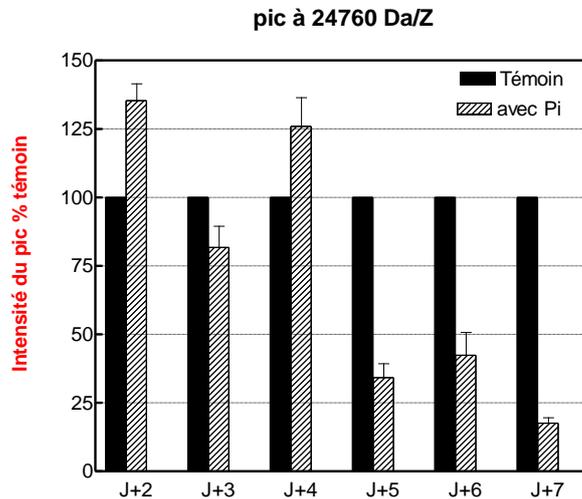


Figure n°26. Évolution du rapport d'intensité des pics discriminants 24760 Da/Z avec Q10 gm. On observe une forte décroissance de l'intensité du pic à partir de J+5.

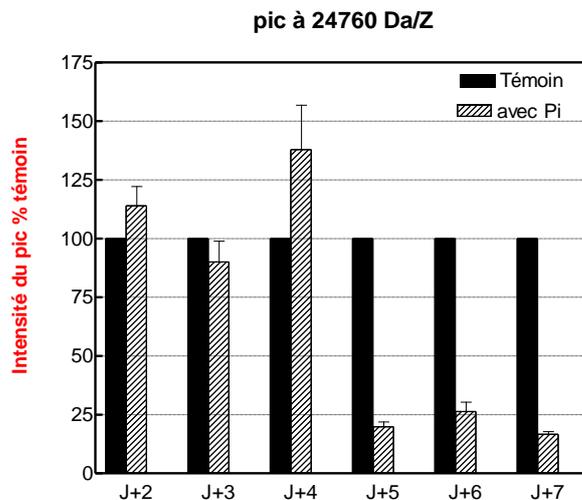


Figure n°27. Évolution du rapport d'intensité des pics discriminants 24760 Da/Z avec CM10 gm. On observe une forte décroissance de l'intensité du pic à partir de J+5.

Sur les tableaux 6 et 7, nous reportons les différentes valeurs des π -values.

Tableau 6. Valeurs des π -values obtenues par le logiciel Biomarker Wizard de CIPHERGEN pour le pic **24760 Da/Z** en fonction des jours d'observation avec la barrette **Q10**

Pic 24760 Da/Z	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7
π -value	0,1722	0,0826	0,0929	0,0008	0,0008	0,0011

Tableau 7. Valeurs des π -values obtenues par le logiciel Biomarker Wizard de CIPHERGEN pour le pic **24760 Da/Z** en fonction des jours d'observation avec la barrette **CM10**

Pic 24760 Da/Z	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7
π -value	0,6744	0,3081	0,2076	0,0008	0,0008	0,0008

Comme pour le pic à 20305 Da/Z, nous sommes ici en présence de l'évolution d'une protéine. Il apparaît que la décroissance est légèrement plus importante avec la barrette CM10.

Désormais, on peut discuter sur la signification de ces biomarqueurs. Pour cela, il faut tout d'abord les identifier après purification et préparation quantitative (ex : chromatographie sur colonne) par des techniques de spectrométrie de masse classiques. Cependant avant cela, on peut s'interroger sur le fait que l'on voit à la fois sur nos spectres des protéines ou des peptides augmenter en intensité ou fortement baisser. On sait que la différenciation des cellules A7r5 s'accompagne d'un processus d'apoptose, libérant des éléments tels que le collagène, l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la sialoprotéine osseuse, les glycosaminoglycannes etc... Ce sont sur ces plages d'apoptose qu'apparaissent les dépôts minéralisés. On peut donc s'attendre à voir ces éléments sur nos spectres et à constater une augmentation significative de leur intensité pour les échantillons phosphatés. Le pic à 12294 Da/Z semble être dans ce cas et donc devrait être un marqueur de la minéralisation des cellules. Cependant, il est très probable que ce processus d'apoptose entraînant la minéralisation des cellules implique aussi la disparition de certaines protéines ou peptides qui ne sont pas forcément liés à la minéralisation mais qui sont des témoins de l'apoptose (mort cellulaire programmée ne déclenchant pas de processus inflammatoire). Les marqueurs correspondant aux pics 9554, 20305 et 24760 Da/Z sembleraient faire partie de ces témoins de l'apoptose mais pas de la minéralisation. Une fois encore, seule une identification de ces marqueurs répondra sans ambiguïté à ces questions.

En conclusion, notre objectif était d'évaluer le degré de différenciation des cellules musculaires lisses (CML) vers le phénotype ostéoblastique minéralisant à partir d'un modèle *in vitro*: CML de rat A7r5. Pour obtenir la transdifférenciation des cellules musculaires lisses A7r5 en culture, nous avons utilisé l'effet d'un promoteur de différenciation et de minéralisation, le phosphate inorganique. Puis, nous avons effectué une étude en protéomique (SELDI-TOF) d'échantillons de cellules A7r5 de rats en comparant des cellules calcifiées avec des cellules témoins simultanément.

Par cette étude, nous avons mis en évidence l'existence de 4 peptides ou protéines de différenciation : une à évolution croissante en fonction du jour d'observation : 12294 Da/Z et trois à évolution décroissante : 9554, 20305 et 24760 Da/Z.

Il s'agit désormais d'identifier ces protéines candidates. Cela doit se faire en trois phases :

- *Phase 1* : Purifier la protéine candidate c'est-à-dire de déterminer les meilleures conditions d'observation pour chaque pic déterminant: Études en fonction du pH, du sel.
- *Phase 2* : Procéder à une digestion de la protéine candidate avec protéase
- *Phase 3* : Identification de la protéine candidate en utilisant la banque de données sur les masses de peptides PBS II

Cette étude d'identification correspond donc à la prochaine étape de notre travail de recherche sur les cellules musculaires lisses A7r5.

2.4 Liste de publications

2.4.1 Articles dans des Revues Internationales à Comité de Lecture (17)

- 1) "Interaction of a density modulated electron beam with a magnetized plasma : emission of whistler waves" C. Krafft, G. Mathieussent, P. Thevenet, **S. Bresson**, **Physics of Plasmas**, 1, 2163 (1994)
- 2) "Raman studies of the C=C and C=O stretching modes in various cholesteryl alkanates" **S. Bresson**, D. Bormann and B. Khelifa, **Phys. Rev. E** 55, 7429 (1997)
- 3) "Raman studies of the C-H stretching modes in various cholesteryl alkanates" **S. Bresson**, D. Bormann and B. Khelifa, **Vibrational Spectroscopy** 16, 153 (1998)
- 4) "Comportement vibrationnel de la double liaison C=O pour plusieurs cholesteryl alkanates" **S. Bresson**, D. Bormann and B. Khelifa, **Lib. SC. Res. Rep.**, 4 3, 107 (1998)
- 5) "Conformational influence on the C=O stretching mode in cholesteryl alkanates studied by Raman spectroscopy" **S. Bresson**, D. Bormann, B. Khelifa, F. Hamza Reguig, A. Krallafa, **Vibrational Spectroscopy**, 21, 27 (1999)
- 6) "Proton transfer mechanisms and structural changes in the cholesteryl acetate" , F. Hamza Reguig, A. Krallafa, D. Bormann, **S. Bresson**, B. Khelifa, **Computational Material Science**, 15, 113 (1999)
- 7) "The particular behavior of the cholesteryl acetate by Raman spectroscopy studies in the spectral range 1700 - 1780 cm^{-1} " **S. Bresson**, B. Khelifa, F. Hamza Reguig, A. Krallafa, **Material Chemistry and Physics**, 64, 66 (2000)
- 8) "A global study of proton transfer mechanisms and structural changes in cholesteryl acetate" M. Benmelouka, **S. Bresson**, B. Khelifa, **Computational Materials Science**, 21 (2), 249 (2001)
- 9) "A study of various cholesteryl alkanates by a semi-empirical quantum calculation" M. Benmelouka, **S. Bresson**, B. Khelifa, **Computational Materials Science**, 22, 185 (2001)
- 10) "Tight-Binding calculation of structural and electronic properties of Cu_3Au and their corresponding clusters" N. Metadger, A. Laref, B. Khelifa, C. Mathieu , **S. Bresson** and H. Aourag, **Super lattices and microstructures**, 30 (No. 1), 21 (2001)
- 11) "FP-LAPW investigations of the electronic structure and bonding mechanism of NbC and NbN compounds" T. Amriou, B. Bouhafs, H. Aourag, B. Khelifa, **S. Bresson**, C. Mathieu, **Physica B condensed matter**, 325, 46-56 (2003)
- 12) "Ab-initio total energy calculations of the optical properties of the CdSnP_2 Pnictide semiconductor", F Chiker, B Abbar, A. Tadjer, H. Aourag, **S Bresson**, C Mathieu, B Khelifa, **Chemical Physics**, 298, 135-140 (2004)

- 13) "Electronic structure and optical properties of ternary CdXP₂ semiconductors (X=Si, Ge and Sn) under pressure" F. Chiker, B. Abbar, A. Tadjer, **S. Bresson**, B. Khelifa and C. Mathieu, **Physica B: Condensed Matter**, 349, 1-4, 181-191 (2004)
- 14) "First investigations of two important components of low density lipoproteins by Raman spectroscopy: the cholesteryl linoleate and arachidonate", **S. Bresson**, M. El Marssi, B. Khelifa, **Vibrational Spectroscopy**, 34, 2, 231-241 (2004)
- 15) "The reflectivity spectra of ZnXP₂ (X=Si, Ge, and Sn) compounds" F. Chiker, B. Abbar, **S. Bresson**, B. Khelifa, C. Mathieu and A. Tadjer, **Journal of Solid State Chemistry**, 177, Issue 11, 3859-3867 (2004).
- 16) "Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides" **S. Bresson**, M. El Marssi and B. Khelifa, **Chemistry and Physics of Lipids**, 134, Issue 2, 119-129 (2005)
- 17) "Conformational influences of the polymorphic forms on the C=O and C-H stretching modes of five saturated monoacid triglycerides studied by Raman spectroscopy at various temperatures", **S. Bresson**, M. El Marssi, B. Khelifa, **Vibrational spectroscopy**, 40 (2), 263-269 (2006)
- 18) "Comparative study of low-density lipoprotein (LDL) and oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) by Raman spectroscopy". **S. Bresson**, M. El Marssi, B. Khelifa, L. Patterson, C. Louandre, M.A. Conte, C. Mazière, J.C. Mazière, **Chemistry and Physics of Lipids**, en révision (2006)

2.3.2 Communications sans acte (6)

- 1) **S. Bresson**, D. Bormann and B. Khelifa. The C=O stretching mode behaviour for various cholesteryl alkanoates. **Poster au Congrès ILCC98 à Strasbourg du 16 au 25 Juillet 1998.**
- 2) **S. Bresson**, D. Bormann and B. Khelifa. Comportements vibrationnels de la double liaison C=O pour plusieurs cholestéryl alkanoates. **Poster au Congrès Euroméditerranéen de la matière condensée CEM2C à Nantes du 8 au 11 Septembre 1998.**
- 3) **S. Bresson**. Etude des propriétés vibrationnelles d'une famille d'ester du cholestérol : les cholestéryl alkanoates". **Communication au Séminaire de recherche du Laboratoire de dynamique et structure des matériaux moléculaires, Université de Lille I, Mai 1999.**
- 4) **S. Bresson**, B. Khelifa. Synthèse des propriétés vibrationnelles d'une famille d'ester du cholestérol : les cholestéryl alkanoates. **Conférence au 1er Congrès Arabe de la matière condensée, Sidi bel abbes, Octobre 1999, Algérie.**
- 5) **S. Bresson**. Etude par simulation numérique de l'athérosclérose. Communication au Séminaire de recherche du Centre de Calculs et de Modélisation de Lens, Université d'Artois, Mai 2002.
- 6) **S. Bresson**, M. El Marssi, B. Khelifa, Conformational influences of the polymorphic forms on the C=O and C—H stretching modes of five saturated monoacid triglycerides studied by

Raman spectroscopy at various temperatures. Communication orale au **XXVIII^e European Congress on Molecular Spectroscopy**, 03-08 Sptembre 2006, Istanbul Turquie.

3 Activités d'encadrement de jeunes chercheurs

3.1 Encadrement d'un doctorant dans le cadre d'un projet de recherche international Franco-Algérien (CMEP)

En 2001, je faisais partir du Centre de Calcul et de Modélisation de Lens (**C.C.M.L.**), laboratoire propre de l'Université d'Artois, dirigé par M. Brahim Khelifa, Professeur des Universités. Nous avons soumis en partenariat avec nos collègues de l'Université de Sidi Bel Abbès (Algérie) un projet de collaboration international intitulé « la modélisation multi-échelle et la prédiction de nouveaux matériaux ». Ce projet a été accepté dans le cadre de l'accord programme du C.M.E.P. (Comité Mixte d'Evaluation et de Prospective) Inter-universitaire Franco-Algérien **n° 02 MDU 546**. Il a été validé pour 4 ans (2002-2006). Dans ce projet, il y avait un programme de travail en commun entre les deux laboratoires (le CCML pour le côté français et le CMSL (Computational Material Science Laboratory) de l'Université de Sidi Bel Abbès). Dans ce cadre, j'ai été amené à encadrer en thèse M^{lle} Fafa Chiker. Il s'agissait d'un encadrement à 50% de la thèse de doctorat sur le thème suivant : « Étude de premier principe des propriétés électronique et positronique des semi-conducteurs ternaires ZnXP₂ et CdXP₂ (X= Si, Ge et Sn) ». Il s'agit ici d'une co-tutelle de thèse entre l'Université d'Artois et l'Université de Sidi Bel Abbès (Algérie). La soutenance a eu lieu le 16 février 2006 à l'Université de Sidi-Bel-Abbes. M^{lle} Fafa Chiker a obtenu la mention très honorable. Cette thèse a fait l'objet déjà de 3 articles dans des revues internationales à comité de lecture.

3.2 Encadrement d'un stagiaire de Master 2

J'encadre à 100% un stage de MASTER 2 (Santé : interaction moléculaire et pathologie humaine et recherches thérapeutiques) pour l'année universitaire 2005/2006. Le titre du stage de M^{lle} Fatiha Assamti est : Étude protéomique (SELDI-TOF) de la différenciation des cellules musculaires lisses A7R5 en « osteoblast-like cells » .

4 Synthèse des activités d'enseignement

4.1 Natures disciplinaires des enseignements

Les diverses disciplines enseignées couvrent à la fois les sciences de l'ingénieur, et de la physique générale et de la biophysique. J'ai eu la chance d'avoir à faire des enseignements très variés, tant du point de vue des domaines visités (optique géométrique et physique, Physique générale du CAPES Physique-Chimie et PLP Maths-sciences, électronique, physique industrielle, biophysique), que du niveau des enseignements (DEUG SV et SM, Enseignement supérieur privée SupMédical à la préparation au P.C.E.M. 1 de la Faculté de médecine Henri Warembourg de Lille, CAPES Physique-Chimie et PLP Maths-sciences, DESS filière Technico. Agro. Alimentaire).

Tous ces enseignements, outre l'apport humain, ont bien sûr permis d'acquérir aussi un certain recul dans les activités de recherches, par rapport aux connaissances de base en Physique générale, Biophysique et Sciences pour l'Ingénieur.

4.2 Créations de documents pour l'enseignement

L'enseignement effectué ne s'est bien sûr pas limité à la reproduction d'enseignements pré-existants. Un apport personnel peut être évalué au travers de divers documents réalisés, à partir de documentaires et réflexions personnelles sur les sujets abordés en cours, TD et TP.

- Polycopié de cours sur la mécanique (CAPES Physique-Chimie)
- Polycopié de cours sur l'électromagnétisme (CAPES Physique-Chimie)
- Polycopié de cours sur la thermodynamique (CAPES Physique-Chimie)
- Polycopié de cours sur l'optique géométrique et physique (PLP Maths-sciences)
- Polycopié de cours sur l'électricité (PLP Maths-sciences)

Dans le cadre de la prépa privé SupMédical, je suis en charge depuis sa création en octobre 2005 d'aider les étudiants de 1^{er} année de médecine à réussir leur épreuve de QCM réalisée sur le cours du Professeur de Médecine M. Marchandise. Son cours de Biophysique traite des échanges atomiques et moléculaires (états de la matière, solutions, transports et échanges) et la biophysique des radiations non ionisantes. Mon travail consiste à reprendre le cours en effectuant des polycopiés adaptés aux QCM posés et à réaliser des QCM originaux. Ce travail représente 40 heures de ED.

4.3 Encadrement de stagiaires I.U.F.M.

L'enseignement traditionnel s'est accompagné aussi d'encadrements plus rapprochés des étudiants, dans le cadre de tuteur de suivi de stagiaires de 2nd année d'I.U.F.M. Il s'agissait d'être le représentant I.U.F.M. de stagiaires auprès de leur établissement d'affectation pendant leur année de stage en responsabilité et de les aider dans leur apprentissage du métier d'enseignant. Il s'agissait aussi de les encadrer dans l'élaboration d'un mémoire professionnel (de 30 pages) sur un thème de leur choix. J'ai encadré ainsi 18 mémoires.

5 Responsabilités administratives

Depuis mon entrée à L'ENS de Cachan, j'ai toujours eu le souci de participer à la vie administrative de mon établissement. C'est ainsi que j'ai été élu à de nombreux conseils et commissions. Ces principales responsabilités administratives sont détaillées ci-dessous :

- Membre élu au **Conseil scientifique et pédagogique de l'I.U.F.M. d'Amiens** (2004-2008).
- Membre de la **commission recherche de l'I.U.F.M. d'Amiens** chargée de la répartition des appels d'offre de projets de recherche au sein de l'I.U.F.M.
- Membre nommé remplaçant de la **Commission de Spécialistes de l'Université Picardie Jules Verne** pour les sections 28-30, 34 (2006-2008).
- Membre du jury de la joute **MAGIPHY** présidée par le professeur des Universités Georges Wlodarczak et organisée par Daniel Droz Président de l'association "MAGIPHY", qui s'est déroulée le Mercredi 25 mai 2005 au Forum des Sciences de Villeneuve d'Ascq avec 6 sites (Boulogne-Wimille, Calais, Lille, Tourcoing-Mouvoux, Hénin-Lens, Valenciennes). Ce sont des élèves de 12 établissements (6 Lycées et 6 Collèges) qui exposent leur travail expérimental pendant 20 minutes devant le jury sur des thèmes de physique - chimie imposés au départ en début d'année scolaire : la couleur des plumes d'oiseaux, la goutte d'eau, effet de serre et lunettes anti-reflets, l'effet photoélectrique, la lumière onde ou particule, le jardin médicinal expérimental.

- Membre élu remplaçant de la **Commission de Spécialistes de l'I.U.F.M. d'Amiens** toutes sections confondues (2004-2007).
- Membre élu titulaire de la **Commission de Spécialistes de l'I.U.F.M. d'Amiens** toutes sections confondues (2001-2004).
- Membre élu au bureau de la **Commission de Spécialistes de l'I.U.F.M. d'Amiens** toutes sections confondues (2001-2004).
- **Président de la commission de validation** pour la titularisation des stagiaires **CAPLC2** en physique-chimie à l'I.U.F.M. d'Amiens en 2001 - 2006.
- Membre élu au Conseil d'UFR de la Faculté Jean Perrin, Université d'Artois (1998-1999).
- Membre élu au Conseil Scientifique de l'Université d'Artois (1997-1999).
- Membre élu aux Conseils d'Administration et Scientifique au Laboratoire de Physique des Gaz et des Plasmas (1993-1995).
- Membre élu au Conseil d'Administration de l'E.N.S. de Cachan (1992).

6 Projet de recherche

6.1 Études de triglycérides mixés par spectroscopie Raman

Le projet de recherche que je compte entamer en spectroscopie Raman concerne les triglycérides mixés. Il s'articulera autour de plusieurs collaborations nationales : M. Mimoun El Marssi, maître de Conférences Habilité au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (L.P.M.C.) et M^{me} Imane Stasik, maître de Conférences au Laboratoire des Glucides à l'Université de Picardie Jules Verne à Amiens ; et internationale : M. Derick Rousseau Professeur des universités au Département de Nutrition à l'Université Ryerson de Toronto, Canada. M. Mimoun El Marssi est le responsable du spectromètre Raman dans son laboratoire. C'est avec lui que j'ai effectué toutes les recherches en spectroscopie Raman concernant les triglycérides monoacides saturés, les LDL et les LDL oxydées. M^{me} Imane Stasik est une collègue chimiste. Ces compétences affirmées en chimie organique nous seront très utiles dans la synthèse de triglycérides mixés. La collaboration avec M. Derick Rousseau est à l'étude pour l'instant. Il s'agirait de faire un parallèle entre la cristallisation des triglycérides mixés et nos résultats en spectroscopie Raman et d'étudier les applications qui pourraient en découler, sachant que son équipe travaille sur les méthodes d'analyses Raman et sur l'aspect biologique de ces molécules. Il s'agit maintenant de décrire le projet en détail.

Jusqu'à présent, j'ai effectué une étude en spectroscopie Raman de triglycérides monoacides saturés qui a mis en évidence l'importance des modes de vibration de la double liaison C=O et C—H dans la détermination des phases polymorphiques de chaque triglycéride étudiés. Il serait judicieux désormais de tirer partie de ces connaissances pour étudier des triglycérides mixés. Il existe de nombreux triglycérides mixés.

Il s'agirait dans un premier temps de considérer des triglycérides ayant trois chaînes alkyles saturées mais de longueurs différentes : par exemple le 1,2 dipalmitoyl-3-myristoyl-*sn*-glycérol (PPM ou 9,9,14), ou le PMP (9,14,9) ; le 1,2 myristoyl-3-lauroyl-*sn*-glycérol (MML ou 14,14,12) ou MLM (14,12,14)... Il se trouve que tous ces triglycérides mixés ne sont pas vendus dans le commerce. C'est pourquoi j'ai pris contact avec une collègue chimiste M^{me} Imane Stasik maître de Conférences au Laboratoire des Glucides à l'Université de Picardie Jules Verne à Amiens afin de synthétiser ces triglycérides. Il existe des méthodes de synthèses de ces matériaux dans la littérature comme celle donnée par D.R. Kodali dans son article « Synthesis and polymorphism of 1,2 Dipalmitoyl-3-acyl-*sn*-glycerols » dans JAOCS, 61 (1984). Une fois synthétisé, nous voudrions savoir par une étude micro-Raman si les modes de vibration de la double liaison C=O et C—H restent aussi pertinents dans la détermination des phases polymorphiques, sachant que pour ces triglycérides il peut exister plus de phases polymorphiques que pour les triglycérides monoacides saturés.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'étudier des triglycérides mixés insaturés tels que le triglycéride SOS (1,3 distearoyl, 2-oleoyl-*sn*-glycerol ou 18,18,18 mais avec une double liaison C=C dans la deuxième chaîne alkyle). Ce triglycéride mixé est d'autant plus intéressant qu'il intervient directement dans le beurre de cacao et qu'il possède 5 phases polymorphiques différentes. Dans ce cas précis, on peut se demander si le mode de vibration de la double liaison C=C ne serait-il pas aussi au même titre que les modes de vibration de la double liaison C=O et des liaisons C—H un marqueur de phases polymorphiques ? Pour cela une étude en spectroscopie Raman s'impose.

Dans un dernier temps, il serait intéressant d'étudier en spectroscopie Raman des phospholipides tels que la phosphatidylcholine. Lors de notre étude des LDL et des OxLDL,

nous avons trouvé des marqueurs de modifications oxydatives qui font intervenir justement ces phospholipides. Une étude séparée d'un de ces constituants des LDL pourrait nous renseigner d'avantage sur l'interprétation des spectres Raman que nous avons obtenus pour les LDL et les OxLDL.

6.2 Études de la calcification valvulaire et vasculaire chez les animaux urémiques à l'aide de la méthode protéomique SELDI-TOF

Mon projet de recherche en protéomique se décline en deux études utilisant la détection SELDI-TOF sur des souris urémiques. La première étude concerne un travail complémentaire de celui réalisé par M. Ziad Massy sur ces mêmes souris. M. Massy a participé à la mise au point d'un modèle d'urémie expérimentale chez la souris transgénique invalidée pour l'apolipoprotéine E (EKO). Les données préliminaires de ce modèle montrent une accélération de la calcification valvulaire et vasculaire chez les animaux urémiques. Il s'agira alors de comparer les spectres obtenus par une étude en protéomique SELDI-TOF des souris « normales » avec ceux observés pour des souris urémiques. Par une étude statistique, il nous sera possible de déterminer des marqueurs biologiques de discrimination entre les deux types de souris. La difficulté de cette étude réside tout d'abord dans l'établissement d'un bon protocole expérimental : quantité de produit, type de barrette, tampon de lavage ... Cette première phase est en cours d'achèvement.

La deuxième étude est inscrite dans un projet de recherche qui vient d'être soumis à l'ANR dans le cadre du programme blanc 2006. Le titre du projet est : « Étude de la circulation cérébrale chez la souris invalidée pour le gène apolipoprotéine E avec ou sans insuffisance rénale chronique ». Ce projet est conduit par M. Jean-Marc Chillon, professeur des universités en pharmacologie dans notre laboratoire. Il concerne l'étude des altérations de la circulation cérébrale dans un modèle de souris invalidée pour le gène de l'apolipoprotéine E (apoE^{-/-}) insuffisante rénale. Ce projet en 3 étapes permettra d'étudier l'impact de l'insuffisance rénale chronique sur la circulation cérébrale, d'explorer les mécanismes intracellulaires mis en jeu et d'évaluer l'impact de traitement.

Les expériences seront effectuées sur des souris apoE^{-/-}. L'insuffisance rénale sera obtenue par électrocautérisation du rein droit et néphrectomie du rein gauche. Nous étudierons la circulation cérébrale par une méthode de fenêtre crânienne chez la souris anesthésiée. Cette méthode permet de mesurer le diamètre interne des artéριοles cérébrales, la pression artériolaire (servonull) et le débit sanguin cérébral (laser Doppler). Après fixation et histologie, nous pouvons également déterminer la surface et la composition de la paroi. Ces études histologiques seront effectuées dans le laboratoire du professeur Gary Baumbach à Iowa City (USA).

Les deux premières expériences auront pour but d'étudier les altérations structurales et fonctionnelles des artéριοles cérébrales et leurs conséquences sur la circulation cérébrale. Nous mesurerons la limite basse de l'autorégulation du débit sanguin cérébral, le remodelage et la distensibilité des artéριοles cérébrales. Nous mesurerons également la surface de la section transversale de coupe et la composition de la paroi par histologie, en collaboration avec le laboratoire du professeur Gary Baumbach à l'Université d'Iowa (USA). Nous explorerons finalement la fonction endothéliale en mesurant la vasodilatation endothélium-dépendante et endothélium-indépendante.

Dans une troisième expérience, nous évaluerons la part jouée par les augmentations de pression pulsée induites par la rigidité artérielle systémique sur les altérations observées. Pour ce faire, nous poserons un clip sur l'artère carotide commune gauche des souris pour diminuer la pression artériolaire pulsée sans réduction significative de la pression artériolaire moyenne. Nous répéterons alors les études effectuées lors de la première expérience chez ces souris.

Dans une quatrième expérience nous examinerons les mécanismes intracellulaires impliqués dans les altérations de la circulation cérébrale. Nous utiliserons une technique qui permet d'isoler spécifiquement les microvaisseaux cérébraux. Nous identifierons sur ces préparations des marqueurs de l'inflammation, du stress oxydant et de l'oxyde nitrique par western Blot, rtPCR, étude protéomique, puce à ADN et dosage du glutathion.

Enfin, dans une dernière série d'expériences, nous évaluerons l'impact de traitements (antioxydants, statines, sevelamer) sur les altérations structurales et fonctionnelles de la circulation cérébrale dans notre modèle de souris.

Bibliographie

- [1] P. Sawzik, B.M. Craven, *Acta Cryst.*, **B35**, 895 (1979)
- [2] H.P. Weber, B.M. Craven, P. Sawzik, R.K. McMulla, *Acta Cryst.*, **B47**, 116 (1991)
- [3] P. Sawzik, B.M. Craven, *Acta Cryst.*, **B35**, 789 (1979)
- [4] S. Bresson, D. Bormann and B. Khelifa, *Phys. Rev. E*, **55**, 7429 (1997)
- [5] S. Bresson, D. Bormann, B. Khelifa, F. Hamza Reguig, A. Krallafa, *Vibrational Spectroscopy*, **21**, 27 (1999)
- [6] J.A.W. Barnard, J.E. Lydon, *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, **26**, 285 (1974)
- [7] S. Bresson, B. Khelifa, F. Hamza Reguig, A. Krallafa, *Materials Chemistry and Physics*, **64**, 66 (2000)
- [8] B.M. Craven, N.G. Guerina, *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 157 (1979)
- [9] N.G. Guerina, B.M. Craven, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2**, 1414 (1976)
- [10] B.M. Craven, G.T. Detitta, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2**, 814 (1976)
- [11] M. Benmelouka, S. Bresson, B. Khelifa, *Computational Materials Science*, **21**, 249 (2001)
- [12] S. Bresson, M. El Marssi, B. Khelifa, *Vibrational Spectroscopy*, **34** (2), 231 (2004)
- [13] N.B. Colthup, L. H. Daly, S.E. Wiberley, *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, 3rd edn., Academic Press, New York, 1990.
- [14] J.W. Hagemann, Thermal behavior and polymorphism of acylglycerides. In : N. Garty and K. Sato, *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*. Marcel Dekker, New York, pp. 9-95 1988
- [15] Hernqvist, L., Crystal structures of fats and fatty Acids. In : N. Garty and K. Sato, *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*. Marcel Dekker, New York, pp. 97-138 1988.
- [16] T.D. Simpson, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60** (1), 19 (1983)
- [17] S. Bresson, M. El Marssi, B. Khelifa, *Chemistry and Physics of Lipids*, **134** (2), 119 (2005)
- [18] S. Bresson, M. El Marssi, B. Khelifa, *Vibrational Spectroscopy*, **40**, 263 (2006)

- [19] T.J Römer, J.F. Brennan, M.L. Fitzmaurice, G. Deinum, J.L. Myles, J.R. Kramer, R.S. Lees, M.S Feld, *Circulation*, **97**, 878 (1998)
- [20] J.F. Brennan, T.J. Römer, R.S. Lees, A.M. Tercyak, J.R. Kramer, M.S. Feld, *Circulation*, **96**, 99 (1997)
- [21] H.P. Buschman, J.T. Motz, G. Deinum, T.J. Römer, M. Fitzmaurice, J.R. Kramer, A. Van der Laarse, A.V. Brusckhe, M.S Feld, *Cardiovascular Pathology*, **10**, 69 (2001)
- [22] P. Lecacheux, G. Ménard, H. Nguyen Quang, A.G. Nguyen Quy Dao, D. Dron, *Spectrochimica Acta Part A*, **52**, 1619 (1996)
- [23] R. Manoharan, Y. Wang, M.S Feld, *Spectrochimica Acta Part A*, **52**, 215 (1996)
- [24] R. Manoharan, J.J. Baraga, R.P. Rava, R.R. Dasari, M. Fitzmaurice, M.S. Feld, *Atherosclerosis*, **103**, 181 (1993)
- [25] S. Bresson, M. El Marssi, B. Khelifa, L. Patterson, C. Louandre, M.A. Conte , C. Mazière, J.C. Mazière, *Chemistry and Physics of Lipids*, soumise (2006)
- [26] J. Twardowski, P. Anzenbacher, Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry. Ellis Horwood and Polish Scientific Publishers PWN, (1994)
- [27] E. R. Molher, *THE LANCET*, **356**, 524 (2000)
- [28] A. Bini, KG Mann, BJ KUdryk, FJ Schoen, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 1852 (1999)
- [29] K. Boström, KE Waston, S. Horm, C. Wortham, IM Herman, LL Demer, *Journal Clin. Invest.*, **91**, 1800 (1993)
- [30] LA. Fitzpatrick, A. Severson, WD. Edwards, RT. Ingram, *Journal Clin. Invest.*, **94**, 1597 (1994)
- [31] KE Waston, K. Boström, R. Ravindranath, T. Lam, B. Norton, LL Demer, *Journal Clin. Invest.*, **93**, 2106 (1994)
- [32] ER. Molher, FH Gannon, C. Reynolds, FS. Kaplan, IM Herman, LL Demer, *Journal Am. Coll. Cardiol.*, **31**, 503A (1998)
- [33] ER. Molher, MK Chawla, AW. Chang, et al, *Journal Heart valve Dis.*, **8**, 254 (1999)
- [34] K. Scmid, WO McSharry, CH. Pameijer, JP. Binette, *Atherosclerosis*, **37**, 199 (1980)
- [35] H. Perlmat, L. Maillard, K. Krasinski, K. Walsh, *Circulation*, **95**, 981 (1997)

Annexe 1

**Convention de cotutelle de thèse pour M^{lle} fafa Chiker
entre l'Université d'Artois
et l'Université de Sidi-Bel-Abbès (Algérie)**

Annexe 2

**Mes 6 principaux articles publiés
dans des revues internationales à comité de lecture**