



HAL
open science

Obésité induite par un régime riche en lipides (HFD) et effet protecteur d'un extrait polyphénolique de raisin (GSSE) : approche protéomique

Selima Smine

► To cite this version:

Selima Smine. Obésité induite par un régime riche en lipides (HFD) et effet protecteur d'un extrait polyphénolique de raisin (GSSE) : approche protéomique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Normandie Université; Université de Tunis El Manar, 2017. Français. NNT : 2017NORMR111 . tel-01744396

HAL Id: tel-01744396

<https://theses.hal.science/tel-01744396>

Submitted on 27 Mar 2018

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.

THÈSE EN CO- TUTELLE INTERNATIONALE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Biologie moléculaire et cellulaire

Préparée au sein de L'Université de Rouen Normandie
et de la Faculté des Sciences de Tunis

Obésité induite par un régime riche en lipides (HFD) et effet protecteur d'un extrait polyphénolique de raisin (GSSE) : Approche protéomique

Présentée et soutenue par
Selima SMINE

Thèse soutenue publiquement le (30/06/2017) devant le jury composé de		
France / Fabrice Homble	Professeur à l'ULB	Rapporteur
Tunisie / Meherzia MOKNI	HDR Institut supérieur de biotechnologie de Béja	Rapporteur
France / Mohamed AMRI	Professeur/ Faculté des sciences de Tunis	Examineur
Tunisie / Thierry JOUENNE	Directeur de recherche au CNRS / Université de Rouen	Examineur
France / Ezzedine AOUMANI	Facultés des sciences de Bizerte	Co-directeur de thèse
Tunisie / Pascal Cosette	Professeur / Université de Rouen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par

M.Pascal COSETTE

Université de Rouen Normandie

M.Ezzedine AOUMANI

Université de Tunis el Manar

Université de Rouen Normandie



Logo École Doctorale



Logo Laboratoire



Logo Établissement



Logo École Doctorale



Logo Laboratoire



Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
1 ^{ERE} PARTIES YNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I. L'OBESITE : FLEAU DU XXIE SIECLE	4
I.1. Généralités.....	4
I.2. Obésité et lipotoxicité.....	7
I.2.1. Obésité et maladies neurodégénératives.....	8
I.2.2 Obésité et maladies cardiovasculaires.....	12
I.2.3 Obésité et maladie hépatique	13
I.2.4 Obésité et maladie rénale	14
I.2.5 Obésité et maladie pancréatique.....	14
II. OBESITE ET STRESS OXYDATIF	15
II.1. Définition du stress oxydatif	15
II.2. Les radicaux libres	15
II.3. Mécanismes de production des dérivés de l'oxygène	17
II.3.1. Sources biologiques des espèces réactives de l'oxygène.....	17
II.3.2. Sources biologiques des espèces réactives de l'azote	18
II.4. Mécanismes de défense contre les ROS	19
II.4.1. Antioxydants primaires	19
II.4.2. Antioxydants secondaires	21
II.4.3. Principe de la supplémentation en antioxydants	21
II.4.4. Supplémentation en antioxydants et obésité	22
III. L'EXTRAIT DE PEPINS ET DE PEAU DE RAISIN (GSSE)	22
III.1. Composition du GSSE	22
III.2. Effets biologiques du GSSE.....	23
III.2.1. Effet antioxydant.....	23
III.2.2. Effet anti-inflammatoire.....	23
III.2.3 Effet anti-vieillessement.....	24
III.2.4. Effet anti-cancéreux	25
III.2.5. Organes protecteurs	25
III.2.5.1. Protection du cœur	25

III.2.5.2. Protection du cerveau.....	25
III.2.5.3. Protection des reins	26
III.2.5.4 Protection du foie	26
IV. LA PROTEOMIQUE.....	27
IV.1. Définition.....	27
IV.2. Démarche protéomique	29
a) Méthodes in-gel.....	31
b) Méthodes off-Gel	34
b.1. La chromatographie en phase liquide LC	34
b.2. Electrophorèse capillaire.....	35
b.3 Système de fractionnement OFFGEL.....	36
IV.3. Spectrométrie de masse et Protéomique	37
IV.3.1. Principe de la spectrométrie de masse.....	37
IV.3.2 . L'ionisation dans la source.....	38
a) L'ionisation chimique.....	38
b) La source MALDI (Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice).....	38
c) La source « electrospray ».....	39
IV.3.3. Les analyseurs	41
a. Les analyseurs à temps de vol (TOF).....	42
b) Les analyseurs quadripolaires.....	44
c) La trappe ionique	45
d) L'analyseur à résonance cyclotronique par transformée de Fourier (FT-ICR)	45
e) L'orbitrap.....	46
IV.3.4. Les détecteurs	48
IV.3.5. Spectrométrie de masse en mode tandem	48
a) Principe.....	48
IV.4. Applications de la spectrométrie de masse aux peptides, aux protéines et au protéome	50
IV.4.1. Identification des protéines : Protéomique descriptive	50
IV.4.1.1. La stratégie « Bottom-Up »	50
a) Identification à partir d'un spectre MSMS	53
b) Méthode Peptide Mass Finger print	54
IV.4.1.2. stratégie Top-Down.....	55

IV.4.2. Quantifications des protéines :La protéomique quantitative	56
IV.4.2.1. Quantification relative par électrophorèse bidimensionnelle	57
IV.4.2.2. Quantification relative par spectrométrie de masse	59
a) Western blot	64
b) ELISA(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	65
c) Dosage par spectrométrie de masse	65
2 ^{EME} PARTIE	68
MATERIEL ET METHODES	68
1. Matériel biologique et protocole expérimental	69
1.1. Animaux et régime alimentaire	69
1.1.1 Animaux.....	69
1.1.2 Régime alimentaire	69
1.1.3 Préparation du GSSE	71
1.1.4 Composition du GSSE	71
1.2. Protocole expérimental	71
2. Etude protéomique différentielle	72
2.1. Extraction des protéines	72
2.2 . Dosage des protéines totales.....	72
2.3 Electrophorèse	72
2.3.1. Electrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide	72
2.3.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2-DE).....	73
a) Précipitation des protéines	74
b) Réhydratation des bandelettes.....	74
c) Focalisation isoélectrique.....	74
d) SDS-PAGE.....	75
2.4. Le Label-free	75
2.4.1. Préparation des échantillons	75
2.4.2. Spectrométrie de masse	76
2.4.3. Identification des protéines	77
2.4.4. Quantification relative par Progenesis LC-MS	77
3. Analyses biochimiques	80
3.1. Dosages enzymatiques.....	80

3.1.1.	Lactate déshydrogénase (LDH)	80
3.1.2.	la L-tyrosinase	80
3.1.3.	Lipase	80
3.1.4.	Glucose-6-phosphatase	81
3.1.5.	Pyruvate déshydrogénase	81
3.1.6.	Les Calpains	82
3.1.7.	L'acétylcholinestérase	82
ASCH	83
3.1.8.	Analyse statistique.....	84
3.2	Marqueurs du stress oxydatif.....	84
3.2.1.	Activités antioxydantes	84
a.	Dosage de la superoxyde dismutase (SOD).....	84
b.	Dosage de la catalase	85
3.2.2.	Dosage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	85
3.2.3.	Dosage du calcium	86
3.2.4.	Dosage du lactate	86
4.	Validation des résultats par Western blot	86
4.1	Electrophorèse SDS-PAGE et transfert.....	86
4.2	Révélation.....	87
3 ^{EME}	PARTIE	89
RESULTATS	89
PARTIE 1 : APPROCHES PHYSICOCHEMIQUES ET BIOCHIMIQUES	90
1.	Effet du HFD et du GSSE sur les paramètres anthropométriques	90
1.1.	Composition du GSSE.....	90
1.2.	Poids corporel.....	91
1.3.	Poids relatifs du cerveau et du tissu adipeux	92
2.	Effet du HFD et du GSSE sur l'enzymologie cérébrale	92
2.1.	Effet du GSSE sur l'activité LDH.....	92
2.2.	Effet du GSSE sur l'activité de la L-tyrosinase.....	93
2.3.	Effet du GSSE sur l'activité de la lipase	94
2.4.	Effet du GSSE sur l'activité de la glucose-6-phosphatase	95
2.5.	Effet du GSSE sur l'activité du pyruvate déshydrogénase.....	96

2.6.	Effet du GSSE sur les calpains	97
2.7.	Effet du GSSE sur l'acétylcholinestérase	98
2.8.	Effet du GSSE sur la superoxyde dismutase (SOD)	98
2.9.	Effet du GSSE sur la catalase	99
3.	Effet du HFD et du GSSE sur les médiateurs de la transduction des signaux	99
3.1.	Calcium cérébral.....	99
3.2.	Lactate cérébral	100
Partie 2 : Etude protéomique		102
1.	De la préparation d'échantillons à l'analyse protéomique quantitative	102
1.1.	Analyse différentielle du protéome total des cerveaux de rats traités	102
1.1.1.	Extraction des protéines à partir des cerveaux et dosage	102
1.1.2.	Séparation sur gel monodimensionnel	102
1.1.3.	Séparation par électrophorèse bidimensionnelle	103
1.2.	Analyse MALDI des échantillons de cerveaux de rats dans les différentes conditions de traitement.....	106
1.2.1.	Analyse MALDI des protéines et des peptides digérés à partir des cerveaux de rats	107
1.2.2.	Conclusion	109
1.3.	Analyse différentielle par l'approche protéomique quantitative (Label-Free).....	110
1.3.1.	Quantification relative à l'aide de Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics)	111
a)	Pre-Processing des données	111
b)	Calcul des valeurs d'aires des pics peptidiques	113
c)	Analyse statistique	114
1.3.2.	Effet du traitement riche en graisse (HFD) sur le profil protéique des cerveaux de rats	117
1.3.3.	Effet du GSSE sur le profil protéique des cerveaux de rats traités (HFD+GSSE) :	126
1.3.4.	Bilan methodologique	131
Partie 3 : Validation des résultats par Western Blot.....		132
4 ^{EME} PARTIE		135
DISCUSSION		135
Partie 1 : Enzymologie cérébrale		136
Partie 2 : Protéomique du cerveau.....		142
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		154

Liste des figures

Figure 1: Obésité et atrophie cérébrale: Image radiologique des différentes régions cérébrales associées à l'IMC pour l'individu âgé sain (en haut) et l'individu porteur de l'allèle FTO lié à l'obésité (en bas). (Ho et al. 2010)	11
Figure 2: Obésité et dysfonctionnement cérébral.....	12
Figure 3: Représentation schématique de l'activation de la NADPH oxydase (DeLeo, 1996).....	18
Figure 4: les étapes de production du monoxyde d'azote (NO°).....	19
Figure 5: Interactions entre les ROS/RNS et les antioxydants primaires.....	20
Figure 6 : Les « Omiques ».....	29
Figure 7: Schéma classique d'une démarche protéomique orientée vers l'analyse de biomarqueurs	30
Figure 8: Schéma de la 2-DE.....	32
Figure 9: Carte protéomique de deux échantillons marqués à l'aide de 2 fluorochromes différents : Cyanine3 et Cyanine5 (Source GE Healthcare).....	34
Figure 10: Système de fractionnement 3100 OFFGEL® (d'après Agilent technologies).....	36
Figure 11: Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse	37
Figure 12: schéma d'une ionisation par la source MALDI.....	39
Figure 13: schéma de l'électronébulisation (ESI)	40
Figure 14: Représentation du calcul de la résolution d'un pic en spectrométrie de masse	41
Figure 15: Trajet d'un ion en mode linéaire dans un analyseur TOF	43
Figure 16: Principe d'un quadripôle à section cylindrique	44
Figure 17: Trajectoire ionique dans un piège ionique	45
Figure 18: Schéma de la résonance cyclotronique des ions dans la cellule ICR.....	46
Figure 19: Représentation d'une cellule Orbitrap (d'après Thermo Fisher Scientific).....	47
Figure 20: Les étapes de la fragmentation	49
Figure 21: Principe de la spectrométrie de masse en mode tandem	49
Figure 22: structure chimique d'un dipeptide	51
Figure 23: Nomenclature mise en place par Roepstorff et Fohlman	52
Figure 24: Spectre de masse MS et MSM.....	53
Figure 25: Spectre de masse de fragmentation permettant d'identifier le peptide 'AVAGCAGAR'.....	54
Figure 26: Spectre de masse correspondant à l'empreinte peptidique d'une protéine	55
Figure 27: Stratégies utilisées pour l'analyse protéomique quantitative	57
Figure 28 Analyse différentielle (comparative/quantitative) de cartes 2D.....	58
Figure 29: Principe de la DIGE (d'après GE Healthcare).....	59
Figure 30: Représentation des approches sans marquage : Spectral Counting et AMT (Mueller et al. 2007)	61

Figure 31: Principe de l'approche AMT (Cosette, Vittecoq et al. 2013)	62
Figure 32: Protocole de Western blot.....	64
Figure 33: Les stratégies de la quantification absolue des protéines en utilisant la dilution d'isotope:.....	66
Figure 34: Principe de l'approche sans marquage « label free ».....	78
Figure 35: effet du GSSE sur l'évolution du poids corporel (A) et du gain de poids des rats (B).	91
Figure 36: Effet du GSSE sur le poids relatifs du tissu adipeux et du cerveau.....	92
Figure 37: Effet du GSSE sur l'activité LDH cérébrale.....	93
Figure 38: Effet du GSSE sur l'activité L-tyrosinase cérébrale.....	94
Figure 39 : Effet du GSSE sur l'activité lipase au niveau du cerveau	95
Figure 40: Effet du GSSE sur l'activité G-6-phosphatase.....	96
Figure 41 : Effet du GSSE sur l'activité PDH	97
Figure 42: Variation de l'activité des calpains au niveau du cerveau chez les 4 lots de rats après 60 jours de traitement au gras et au GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5 rats/lot).	97
Figure 43 : Effet du GSSE sur l'activité AChE	98
Figure 44: Effet du GSSE sur l'activité SOD cérébrale.....	98
Figure 45: Effet du GSSE sur l'activité catalase cérébrale.....	99
Figure 46 : Effet du GSSE sur le taux de calcium cérébral	100
Figure 47 : Effet du GSSE sur le taux de lactate cérébral.....	101
Figure 48: Effet du GSSE sur le taux du H ₂ O ₂ cérébral.....	101
Figure 49: Gel SDS-PAGE d'extraits protéiques de cerveaux coloré au nitrate d'argent.....	103
Figure 50: Cartes 2-DE des échantillons de cerveaux dans les 4 conditions avec un gradient de pH 4-7.	104
Figure 51: Cartes 2-DE du même échantillon traité ou non avec le kit 2-D clean Up.....	105
Figure 52: Spectres de masse MALDI TOF obtenus à partir de cerveaux de rats SD (a), HFD (b), SD+GSSE (c), HFD+GSSE (d) enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice HCCA...	108
Figure 53: Spectres de masse obtenus à partir d'échantillons de cerveaux de rats (a)SD, (b)HFD, (c)HFD+GSSE, (d)SD+GSSE obtenus après digestion trypsique et enregistrés en mode linéaire réflecteur positif après dépôt de la matrice HCCA.....	109
Figure 54: Durée d'alignement des 36 « runs »	112
Figure 55 :Table d'alignement des vecteurs et scores de quelques « runs »	112
Figure 56: Réalignement des cartes 2-D massiques.....	113
Figure 57: Représentation schématique du XIC. (A) :1D, (B) :2D et (C) :3D	114
Figure 58 : illustration des protéines regroupées sous forme d'une PCA	115
Figure 59: Diagrammes de Venn de toutes les protéines identifiées dans les cerveaux de rats SD (A) et HFD (B).....	117
Figure 60: Représentation de l'ACP des échantillons SD (bleu) et HFD (rose).....	121

Figure 61: Clustering hiérarchique	122
Figure 62 :« Heat map » montrant des protéines différentiellement régulées dans les échantillons de cerveau de rats SD et HFD.....	123
Figure 63:Modification des abondances relatives des protéines impliquées dans la signalisation du calcium (A), la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (B) et le HIF (C) après un traitement riche en lipides (HFD). Les protéines présentant une plus grande abondance en HFD sont en rouge et les protéines présentent un niveau inférieur en jaune.....	125
Figure 64 : Représentation de l'ACP des échantillons HFD (bleu) et HFD+GSSE (rose).....	127
Figure 65 :Clustering hiérarchique des protéines différenciées entre les cerveaux de rats HFD et HG (HFD+GSSE).	127
Figure 66:« Heat map » montrant des protéines différentiellement régulées dans les échantillons de cerveau de rats HFD et HG (HFD+GSSE).	128
Figure 67 :Les corrections apportées par l'exposition au GSSE sur les animaux traités par la HFD: les protéines dont le niveau est corrigé par le GSSE sont en vert; les protéines en rose ne sont pas corrigées par le GSSE et les protéines en bleu clair sont de nouvelles protéines induites par le GSSE.....	130
Figure 68: Quantification par western blot d'un ensemble de protéines sélectionnées. Les résultats sont présentés par mesure des intensités des bandes après une analyse western blot : VDAC (voltage-dependent anion channel) (A), Eno1 (alpha-enolase) (B), PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (C) et Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (D).....	133
Figure 69: Quantification relative par Label-free. Les résultats sont présentés par mesure des abondances relatives dans les différentes répétitions (biologiques et techniques) pour chaque condition : VDAC2 :Voltage dependent anion channel (A), VDAC (voltage-dependent anion channel) (A), Eno1 (alpha-enolase) (B) et Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (C).....	134

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de l'IMC chez l'adulte. Source OMS (1998)	5
Tableau 2 : Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote(Sun, Chen, et Rigas 2009) :.....	16
Tableau 3 : Principales performances et caractéristiques des analyseurs	42
Tableau 4 : Récapitulatif des approches de quantification en protéomique	63
Tableau 5: Composition de la nourriture des rats (ALMAS, Mateur, Bizerte).....	69
Tableau 6: Composition de la graisse d'agneau.....	70
Tableau 7: composition des gels utilisés pour la SDS-PAGE.....	73
Tableau 8: Anticorps utilisés en western blot.	88
Tableau 9: Compositions des tampons d'un gel SDS	88
Tableau 12: composition du GSSE de Carignan en polyphénols totaux.....	90
Tableau 13: Analyse par LCMS/MS de quelques composés phénoliques trouvés dans le GSSE du Carignan	90
Tableau 10: Représentation des voies canoniques les plus importantes présentes dans les différents ensembles de données.	116
Tableau 11: Identification des 37 protéines montrant une abondance différentielle entre les cerveaux de rats standard (SD) et les rats traités à la graisse (HFD).	120

“Manger est une nécessité, mais manger intelligemment est un art.”

(La Roche Foucauld)

Introduction générale

La prévalence du surpoids et de l'obésité a fortement augmenté ces trente dernières années. En effet, à l'échelle mondiale, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980. Cette augmentation alarmante est probablement due à différents changements environnementaux et sociétaux et à un manque de politiques de soutien qui ont fait évoluer les habitudes en matière d'alimentation et d'exercice physique (nature de plus en plus sédentaire de nombreuses formes de travail, évolution de l'urbanisation et des modes de transport, etc). Ce nouveau mode de vie « occidentalisé » serait responsable de l'augmentation de la prévalence de l'obésité et des maladies associées. L'obésité et le surpoids sont des facteurs de risque importants de maladies chroniques, telles que les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les problèmes respiratoires, le diabète, les cancers, etc.

La cause fondamentale de l'obésité et du surpoids est un manque d'activité physique, couplé à une consommation importante d'aliments hypercaloriques riches en graisses et en sucres, mais pauvres en vitamines, en minéraux et autres micronutriments. Cette pathologie peut donc, en grande partie, être évitée si chacun veille à limiter ses apports énergétiques et à avoir une activité physique régulière.

Aujourd'hui, la prise de conscience des problèmes causés par l'obésité et le surpoids favorise le développement de diverses suppléments alimentaires pouvant aider à lutter contre cette pathologie. Dans ce contexte, nous avons voulu étudier les effets d'un extrait polyphénolique de raisin (GSSE), particulièrement riche en antioxydants, sur un modèle animal d'obésité afin d'en mieux comprendre les mécanismes d'action ainsi que les voies métaboliques touchées par le régime riche en graisse (HFD) au niveau du cerveau et corrigées par le GSSE. Pour ce faire, la recherche de biomarqueurs liés à une exposition à un composé particulier est devenue un des points centraux de l'analyse protéomique. Elle permet de comprendre les causes d'apparition d'une pathologie, voire de l'obésité et d'améliorer sa prévention.

L'objectif de ce travail est d'étudier le protéome cérébral, dans un cas d'obésité provoqué expérimentalement chez le rat par un régime riche en graisse, ainsi que la capacité d'un extrait GSSE à prévenir et à protéger l'organisme contre les effets délétères d'une surcharge lipidique sur la protéomique du cerveau et les voies métaboliques impliquées dans la lipotoxicité.

Ce manuscrit est divisé en quatre parties :

La première partie est un rappel bibliographique sur l'obésité, le stress oxydatif, les effets bénéfiques du GSSE ainsi que la protéomique.

La seconde partie est consacrée à la présentation du matériel et des méthodes utilisées.

La troisième partie concerne toutes les optimisations et les résultats au cours de ce travail de thèse, depuis la préparation des échantillons jusqu'à l'analyse protéomique quantitative et l'identification des protéines et des voies métaboliques liées à l'exposition aux différents traitements (HFD et GSSE).

La quatrième partie est une discussion générale des résultats obtenus suivie par une conclusion générale et les perspectives du travail présenté.

1^{ère} partie

Synthèse Bibliographique

I. L'obésité : Fléau du XXI^e siècle

I.1. Généralités

Parler de notre besoin d'oxygène pour respirer a la même importance que notre besoin d'énergie pour que toutes les cellules de notre organisme fonctionnent. Parmi les aliments qu'on ingère l'énergie est apportée par les glucides, les protéines et les lipides, ces derniers étant les plus énergétiques. Lorsqu'un déséquilibre en faveur de la quantité d'énergie apportée s'installe dans notre organisme, ce dernier stocke des réserves sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Ainsi un excès d'apports et/ou une diminution des dépenses énergétiques favorise l'obésité (Bray 1987). L'obésité se présente donc comme un résultat direct d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétique.

L'obésité et le surpoids ont été définis comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé ». Cette définition a été élaborée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) qui a officiellement déclaré la gravité de la pandémie d'obésité suite à une mesure globale du taux d'obésité en 1997. L'estimation du surpoids ou de l'obésité d'une personne se fait par la mesure de l'indice de la masse corporelle (IMC) qui correspond au rapport du poids de l'individu (en kilogrammes) sur le carré de sa taille (en mètres) :

$$\text{IMC} = \text{P (Kg)} / \text{T (m}^2\text{)}$$

Cette mesure est la plus largement utilisée pour les études épidémiologiques et cliniques et demeure la plus fiable à ce jour (Polk 2005). Le surpoids est défini lorsque l'IMC est compris entre 25 kg/m² et 30 kg/m², alors qu'un individu est obèse lorsque son IMC est supérieur à 30 kg/m² (Kopelman 2000). Au delà de 35 kg/m² l'obésité est considérée comme sévère et enfin, pour un IMC supérieur à 40 kg/m² on parle d'obésité morbide (Abe 1998) qui engendre des problèmes de santé souvent mortels (« Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation » 2000). Le tableau 1 montre la classification de l'IMC chez l'adulte en fonction du risque de morbidité.

Classification	Catégorie de L'IMC (Kg/m ²)	Risque de morbidité
Insuffisance pondérale	<18,50	Accru
Poids normal	18,50 à 24,9	Moyen
Surpoids	25 à 29,9	Accru
Obésité , classe I	30 à 34,9	Modérée
classe II	35 à 39,9	Sévère
classe III	>40	Massive

Tableau 1 : Classification de l'IMC chez l'adulte. Source OMS (1998)

Il existe deux types d'obésité : l'obésité androïde qui correspond à un excès de tissu adipeux au niveau abdominal et l'obésité gynoïde lorsque l'excès se situe au niveau des cuisses et des hanches. Cette dernière est généralement observée chez les femmes.

Les personnes souffrant d'une obésité de type abdominal ont plus de risque que les autres de développer des complications (Blackburn et al. 2006).

L'obésité a été reconnue comme une maladie en 1997. Depuis elle est en constante augmentation tant dans les pays développés qu'en voie de développement. Cette pandémie fait des ravages dans le monde entier : « 1 mort d'obésité toutes les minutes en Europe / USA ». (Source *L'obésité : de l'individu à la société 2004*) Le constat alarmant de ce chiffre démontre bien que nous, citoyens du monde, sommes confrontés désormais à un véritable problème de santé. Le surpoids concerne 1,4 milliard de personnes de plus de 20 ans, parmi lesquelles 500 millions sont obèses. En France, on comptait plus de 6,9 millions d'obèses en 2012 (de Stampa et al. 2012). Il est donc important et urgent de mieux comprendre les différents facteurs régissant la prise de poids afin d'arriver à une prévention plus efficace de l'obésité. En effet, plusieurs facteurs sont à l'origine de l'explosion du nombre d'obèses. Parmi ces facteurs, on peut citer les facteurs d'origine génétique, héréditaire ou non, d'ordres environnementaux, métaboliques, psychologiques, culturels ou économiques, sociaux et politiques (Wells 2006).

Il n'existe sûrement pas un gène de l'obésité. Sur les trente mille gènes humains, un petit nombre aurait un impact important sur la corpulence et la distribution régionale de la masse grasse.

Par exemple le gène FTO (fat mass and obesity associated) qui est impliqué dans l'évolution du poids (Frayling et al. 2007) de même que le gène baptisé ADP (Adipose) qui régule l'accumulation des graisses dans l'organisme (Suh et al. 2007). Il y a aussi les protéines UCP (uncoupling proteins) et la leptine qui sont susceptibles d'être impliquées dans la génétique de l'obésité : les UCP sont des protéines qui favorisent la production de chaleur dans la mitochondrie tandis que la leptine est une hormone, produit du gène ob (obèse), qui agit principalement sur le contrôle de la prise alimentaire. Des études ont montré, chez les souris comme chez les humains, qu'une mutation dans le gène de la leptine (ob/ob) provoque l'apparition d'une obésité (Zhang et al. 1994). Les mêmes conséquences sont observées si le gène de son récepteur (db) n'est pas fonctionnel.

Cinq grandes classes de traits génétiques associés à l'obésité ont été identifiées dans une revue de génome humain (Bouchard 2007):

- un métabolisme énergétique de base faible
- une absence de prédisposition à l'activité physique
- un défaut d'oxydation des lipides
- une grande capacité de stockage des lipides
- une régulation altérée de la satiété

Par conséquent, il semble y avoir une grande variété dans les types d'anomalies génétiques pouvant être à l'origine de l'obésité.

L'hérédité jouerait un rôle important dans la prise de poids. Il a également été constaté que si l'un des parents est obèse le risque que leur enfant devienne obèse à l'âge adulte peut atteindre 40% et même 80% si les deux le sont. Bien que des facteurs héréditaires soient liés à l'apparition de l'obésité, ce sont les facteurs environnementaux qui sont à l'origine de la progression fulgurante de cette maladie.

Les facteurs environnementaux sont complexes et multiples : déséquilibre des rythmes alimentaires (aliments industriels hyper-énergétiques, alimentation riche en lipides, grignotages), troubles psychologiques (stress, manque de sommeil), dérèglement hormonal (grossesse, ménopause), microbiote intestinal (Ley 2010), le vieillissement (diminution des dépenses énergétiques totales alors que les apports restent souvent constants), prise de médicaments (neuroleptiques, corticoïdes, pilule, tricycliques), arrêt du tabac.

Par ailleurs, une grande responsabilité est attribuée à un facteur environnemental: le mode de vie sédentaire. Il s'explique par une diminution de l'activité physique et une alimentation énergétique élevée (plus riche en graisses et en sucres mais pauvres en micronutriments non énergétiques d'intérêt comme les vitamines, polyphénols et minéraux) (Colmers 2006; Shrewsbury et Wardle 2008, 1990, 2005).

Il est clair que l'obésité est une maladie multifactorielle. C'est bien le résultat d'une susceptibilité génétique sous l'influence de facteurs environnementaux. De plus le mode de vie sédentaire est probablement en grande partie responsable de ce « nouveau mal du siècle » qu'est l'obésité et a une certaine influence sur les facteurs génétiques.

I.2. Obésité et lipotoxicité

L'obésité ne constitue pas une pathologie en elle-même. L'obésité est délétère pour l'organisme car elle est considérée comme un facteur de risque majeur de nombreuses perturbations métaboliques rassemblées sous le terme de syndrome métabolique (Hubert et al. 1983).

L'obésité amplifie le risque des maladies chroniques comme le diabète de type 2, (DT2), l'hypertriglycéridémie, l'insulino-résistance, la diminution du taux de cholestérol-HDL, les dyslipidémies, les maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle (HTA), l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque et les accidents vasculaires cérébraux et périphériques ainsi que de nombreux types de cancers.

L'hyperlipidémie accompagnant l'obésité peut être associée aux dépôts ectopiques de lipides (stéatose) au niveau des tissus non adipeux, tels que le foie, le pancréas, les muscles squelettiques, le cœur et le cerveau, bien que ces organes puissent initialement stocker une partie de ce surplus comme triglycérides. Les triglycérides excédentaires peuvent être à l'origine de phénomènes apoptotiques, révélant ainsi une action lipotoxique (Unger et Orci 2002). La lipotoxicité est le processus par lequel cette surcharge lipidique conduit à un dysfonctionnement puis à la mort cellulaire par apoptose et finalement au dysfonctionnement de l'organe (Unger 1995). Les manifestations de la lipotoxicité dépendront de l'organe touché. Dans les tissus ayant une bonne capacité régénératrice, comme le foie, la surcharge lipidique entraîne essentiellement l'atteinte des voies de signalisation de l'insuline, entraînant une résistance cellulaire et systémique à l'insuline (Shulman 2000). Dans les organes ayant peu ou pas de capacité de régénération, comme le pancréas ou le cerveau, la progression vers une défaillance d'organe est encore plus marquée.

I.2.1. Obésité et maladies neurodégénératives

L'obésité est considérée comme un facteur de risques pour un certain nombre de maladies neurodégénératives (Subba Rao et al. 2008). Les maladies neurodégénératives constituent un groupe de pathologies liées à un dysfonctionnement métabolique au sein du tissu nerveux, conduisant à la mort des neurones et à la destruction du système nerveux. Le cerveau et la moelle épinière peuvent être touchés par des lésions diffuses ou limitées à certaines zones spécifiques.

D'après l'INSEE (Institut national de la statistique et des études économiques), les maladies neurodégénératives telles que Parkinson, Alzheimer, Huntington ou autres (syndrome de Down / trisomie 21, Ataxie de Friedrich, syndrome de Prader-Willi) sont la 5^{ème} cause de mortalité en France.

Le plus grand facteur de risque pour les maladies neurodégénératives est le vieillissement. Comme tous les organes, le cerveau subit le processus du vieillissement mais contrairement aux autres organes, très peu de cellules composant le cerveau se renouvellent. Quand un nombre important de neurones dégénèrent, les conséquences sont importantes en termes d'invalidité. Le cerveau subit ensuite des modifications anatomiques structurelles et fonctionnelles complexes s'accompagnant parfois de troubles cognitifs qui deviennent plus fréquents avec l'âge.

Par exemple, la maladie d'Alzheimer est la plus répandue d'un groupe important de maladies neurodégénératives appelées « démences ». Il s'agit d'affections cérébrales à évolution lente dont la probabilité d'apparition augmente avec l'âge. Ce type d'affection se traduit par une dégénérescence progressive de certaines zones du cerveau due à la mort des neurones. Cela entraîne une détérioration des facultés cognitives et de la mémoire provoquant une démence sénile. La maladie d'Alzheimer touche :

- 5% de la population âgée de plus de 65 ans et double à peu près tous les quatre ans pour atteindre environ 30 % chez celle âgée de 80 ans.
- 25 millions de personnes dans le monde.
- Plus de 4 millions de malades aux Etats Unis.
- Près d'un million de français âgés de plus de 65 ans.
- Trois fois plus chez la femme que chez l'homme.

- 50 % des malades ont des troubles du comportement alimentaire
- 30 à 40% des malades perdent du poids avant l'apparition des premières manifestations.
- 50% des malades de plus de 50 ans présentent la démence.

Avec de telles évolutions, il ne fait pas de doute que la maladie d'Alzheimer va devenir un réel problème de société d'ici quelques années.

Plusieurs facteurs de risque de la démence ont déjà été identifiés, notamment l'obésité. Des études cliniques ont montré que les patients obèses ont un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer (Whitmer et al. 2007). D'ailleurs, le Pr D. Gustafson a été le premier à démontrer la relation entre le surpoids et les risques de développer cette maladie dans une étude sur un échantillon de population suédoise (Gustafson et al. 2003).

De plus, des études épidémiologiques et des expériences sur l'animal ont montré que la composition de l'alimentation peut avoir un impact sur la démence. En effet, l'alimentation riche en graisses saturées, cholestérol, acide linoléique et en sucres raffinés augmente le risque de démence et diminue la plasticité neuronale et l'apprentissage (Kalmijn 2000). Cela pourrait être dû à une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation dans le cortex cérébral et à une diminution d'un facteur neurotrophique, le BDNF (Brain derived neurotrophic factor) (Molteni et al. 2002; Zhang et al. 2005). Il a été démontré que le surpoids et l'obésité contribuent au stress oxydatif et à l'inflammation chronique, qui pourraient affecter le fonctionnement du cerveau et développer la maladie d'Alzheimer. Plusieurs études indiquent que cette inflammation est présente dans le cerveau, suggérant qu'une inflammation en périphérie peut provoquer une neuroinflammation chronique et une neurodégénérescence progressive (Qin et al. 2007).

L'effet du surpoids ou d'une obésité ne se limite pas à cette maladie; il a également été démontré une relation entre l'indice de masse corporelle, l'atrophie cérébrale et les lésions de la substance blanche chez la femme (Gustafson et al. 2004).

En effet, chez les personnes obèses, des anomalies dans la structure du cerveau ont été observées. Des études ont montré que l'augmentation de l'IMC est associée à la réduction du volume cérébral (Ward et al. 2005). D'autres études ont confirmé ces changements structurels dans le cerveau, en particulier dans le lobe frontal en montrant une diminution du volume de la substance blanche dans ce lobe (Pannacciulli et al. 2006). Parce que le lobe frontal est plus

sensible aux effets du vieillissement que les autres lobes, ces données pourraient suggérer que l'obésité pourrait accélérer le vieillissement.

En IRM, il a également été montré que le volume de la substance blanche dans plusieurs régions du cerveau est plus réduit chez les personnes obèses par rapport aux personnes non obèses (Haltia et al. 2007). Récemment, deux études ont montré que l'obésité est associée à une atrophie cérébrale et à un risque accru de maladie d'Alzheimer.

La première étude a montré que l'obésité abdominale est associée à une diminution du volume cérébral et à un risque de démence accru plus tard dans la vie chez des personnes d'âge moyen en bonne santé (Debetto et al. 2010). Cette étude a été menée sur 733 personnes d'un âge médian de 60 ans. Les chercheurs ont examiné l'association de différents indicateurs de l'obésité y compris l'IMC, le RTH, la circonférence de la taille et la graisse abdominale avec le volume total du cerveau, la densité de la substance blanche cérébrale et la présence de plaques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Ils ont trouvé que les indicateurs d'obésité étaient inversement corrélés avec le volume total du cerveau. Cette corrélation inverse était plus forte pour l'obésité abdominale avec un risque accru de démence et de maladie d'Alzheimer.

La seconde étude a montré qu'une variation spécifique du gène FTO lié à l'obésité est associée à une atrophie cérébrale, augmentant ainsi le risque de maladie d'Alzheimer (Ho et al. 2010).

En effet, ils ont comparé les imageries cérébrales de 200 personnes âgées de 55 à 90 ans.

Celles qui portaient cette variation avaient en moyenne 8% moins de tissus dans les lobes frontaux (souvent qualifiés de centres de commandes) et 12% de moins dans les lobes occipitaux (centres de la vision et d'autres perceptions) (Fig.1).

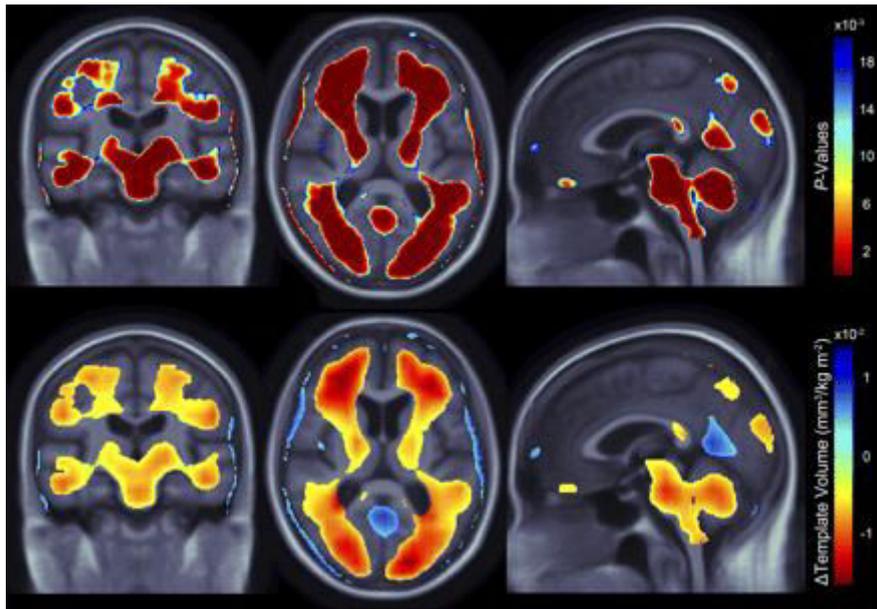


Figure 1: Obésité et atrophie cérébrale: Image radiologique des différentes régions cérébrales associées à l'IMC pour l'individu âgé sain (en haut) et l'individu porteur de l'allèle FTO lié à l'obésité (en bas). (Ho et al. 2010)

C'est la conclusion d'une nouvelle recherche qui a établi que les individus âgés obèses ou en surpoids avaient sensiblement moins de tissu cérébral que les individus de poids normal.

L'essentiel de la disparition du tissu cérébral a lieu dans les régions des lobes frontal, temporal et occipital du cerveau. Ainsi, une diminution du volume cérébral augmente le risque de maladie d'Alzheimer en réduisant la réserve dont dispose une personne pour compenser les effets des plaques cérébrales caractéristiques de la maladie. Les accidents vasculaires cérébraux peuvent aussi réduire la quantité de tissus et ainsi diminuer les réserves cérébrales. Des études ont démontré que l'obésité, comme le vieillissement, est un facteur de risque majeur de l'accident vasculaire cérébral ischémique (AVC ischémique) (Kurth et al. 2002; Rexrode et al. 1997). Par ailleurs, des données épidémiologiques suggèrent que les patients obèses souffrent plus de complications et de mortalité que les patients non obèses après un traumatisme crânien (Brown et al. 2006).

Une autre étude montre que la dopamine peut être un acteur clé dans l'obésité. Elle peut jouer aussi un rôle central sur les structures du cerveau et intervient sur le fonctionnement de toutes les activités cognitives. En se liant sur son récepteur, la dopamine peut être impliquée dans plusieurs processus neurologiques du SNC comme la cognition, la mémoire, l'apprentissage. En effet, dans une étude d'imagerie cérébrale faite avec un PET scan (Positron Emission Tomography), il a été démontré que les personnes obèses posséderaient moins de récepteurs à la dopamine par rapport à des personnes de poids normal (Fig. 2)(Wang et al. 2001).

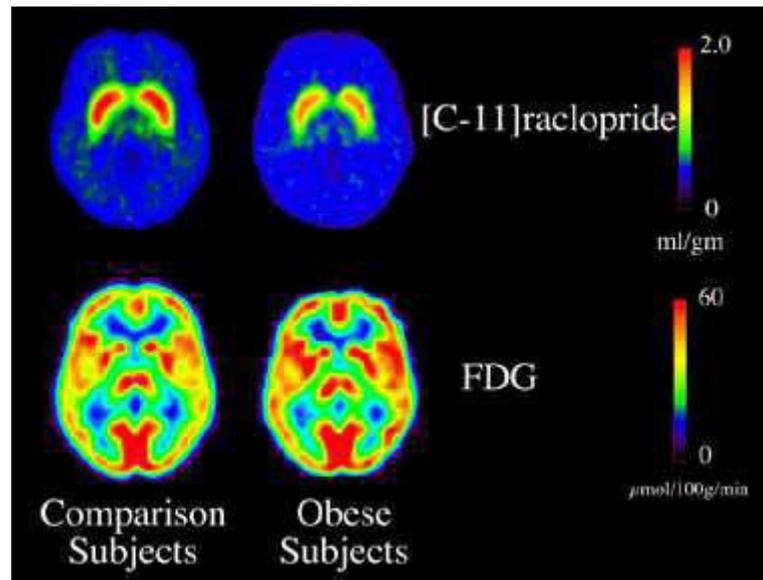


Figure 2: Obésité et dysfonctionnement cérébral

Imagerie cérébrale PET au [C-11] raclopride, un antagoniste récepteurs D2 dopaminergiques et au FDG, Fluorodesoxyglucose exprimant l'activité métabolique pour l'individu de poids normal et l'individu obèse. Source: (Wang et al. 2001).

Enfin, toutes ces études suggèrent que le surpoids et l'obésité peuvent avoir un effet direct sur l'accélération du processus de vieillissement comme elles peuvent augmenter le risque de développer des maladies neurodégénératives ainsi que la susceptibilité à des neurodégénérescences aiguës induites par des facteurs exogènes (un traumatisme, une exposition à des agents chimiques) ou des facteurs endogènes (une ischémie, un accident vasculaire cérébral).

I.2.2 Obésité et maladies cardiovasculaires

Les complications cardiovasculaires constituent la principale cause de morbidité et de mortalité chez les personnes obèses. En effet, elles jouent un rôle important dans la genèse de l'insuffisance cardiaque et des arythmies. L'arythmie est un phénomène fréquent responsable de la mortalité après un infarctus du myocarde. Le 4-hydroxynonéal peut promouvoir une arythmie cardiaque en inhibant les canaux potassium entraînant une dépolarisation membranaire et un prolongement du potentiel d'action (Bhatnagar et al. 1995).

Trois mécanismes physiopathologiques sont à l'origine des effets délétères de l'obésité sur la fonction ventriculaire gauche : l'augmentation de la précharge ventriculaire secondaire à la majoration du volume plasmatique induite par l'élévation de la masse grasse ; l'augmentation de la postcharge ventriculaire gauche due à l'association fréquente d'une hypertension

artérielle ; l'altération des fonctions systoliques et diastoliques, secondaire aux modifications du génome myocardique et aux maladies coronariennes aggravées par les facteurs de risque d'athérosclérose. De plus l'adipocyte sécrète de nombreuses hormones pouvant agir directement ou indirectement sur le myocarde : angiotensine II, leptine, resistine, adrénoméduline, cytokines. Les modifications hémodynamiques et hormonales vont profondément modifier l'expression génique myocardique au cours de l'obésité, favorisant l'apparition d'une hypertrophie myocytaire et d'une fibrose interstitielle. Chez l'obèse, deux types d'insuffisances cardiaques sont ainsi possibles. Le plus fréquent, il s'agit d'une insuffisance cardiaque diastolique. L'insuffisance cardiaque systolique est rarement apparue dans deux circonstances : soit en cas d'hypertrophie ventriculaire gauche inadaptée ne permettant pas de normaliser les contraintes pariétales, à l'origine de la cardiomyopathie de l'obèse, soit en cas de maladies coronariennes associées. Quel qu'en soit le mécanisme, l'existence d'une obésité majeure le risque de mort subite induite par des altérations cardiovasculaires (Galinié et al. 2006).

I.2.3 Obésité et maladie hépatique

Les manifestations de la lipotoxicité dépendront de l'organe touché. Dans les tissus ayant une bonne capacité régénératrice, comme le foie, la surcharge lipidique entraîne essentiellement l'atteinte des voies de signalisation de l'insuline, entraînant une résistance cellulaire et systémique à l'insuline (Shulman 2006).

Étant un organe essentiel dans le métabolisme énergétique, le foie synthétise le cholestérol et les triglycérides (TG) et il produit et « recycle » les lipoprotéines. Compte tenu de ce rôle dans le turn-over lipidique, il n'est pas surprenant que le foie présente des réserves lipidiques sous forme de TG. Chez l'homme sain, le contenu hépatique lipidique est faible puisqu'il ne représente que 5% du poids total du foie. Par contre chez un individu obèse, cette limite de stockage est dépassée et entraîne une stéatose hépatique. Trois différentes voies d'afflux d'AGL au foie sont responsables de cette stéatose. La première est due à la position du tissu adipeux viscéral qui va libérer dans la veine porte une grande quantité d'AGL qui va parvenir directement au foie. La seconde voie est celle de l'alimentation. En effet, en réponse à un régime riche en gras, le foie se charge rapidement en vacuoles lipidiques. Pour preuve plusieurs études chez les rongeurs mais aussi chez l'Homme ont montré que deux semaines d'alimentation riche en lipides pouvaient induire une stéatose hépatique, ce phénomène étant également rapidement réversible lors d'une alimentation isocalorique. Enfin, le troisième type d'apport en AGL au foie est constitué par le foie lui-même. En effet, étant capable de la

lipogénèse de novo, le foie peut contribuer de 25% environ à la synthèse de triglycérides hépatiques chez l'obèse, ce qui représente 4 à 5 fois plus que chez un sujet sain (Postic et Girard 2008).

La stéatose hépatique a été associée à la présence d'une résistance à l'insuline (Yki-Järvinen et Westerbacka 2005). Cependant, sa gravité réside dans son risque d'évolution vers des lésions de type fibrose pouvant aboutir à une cirrhose et éventuellement se compliquer en hépatocarcinome, alors que la stéatose simple est considérée comme un état bénin. La présence de lésions inflammatoires, dans le cadre de la stéatohépatite (ou NASH, non alcoholic steatohepatitis) est beaucoup plus préoccupante.

I.2.4 Obésité et maladie rénale

L'obésité viscérale s'accompagne du taux circulant de cholestérol, de TG et d'AGL. Ces lipides excédentaires peuvent s'accumuler dans le rein (stockage ectopique), entraînant des dysfonctionnements cellulaires conduisant à la mort des cellules (lipotoxicité) (Wennberg et Zimmermann 2006). A ce niveau l'excès de lipides altère la physiologie des tubules proximaux via la réabsorption excessive, par les cellules épithéliales tubulaires, d'acides gras, de phospholipides ou de cholestérol associés aux protéines filtrées, comme l'albumine ou les lipoprotéines. Cela conduit à une inflammation tubulo-interstitielle, à la formation de cellules pumeuses et à une atteinte de la fonction rénale (Kamijo et al. 2002). Il a aussi été démontré que les souris obèses développent une glomérulosclérose associée à une fibrose tubulo-interstitielle résultant de l'accumulation intra rénale de triglycérides concomitante à l'induction des facteurs de transcription de la famille des *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) (Wang et al. 2005). L'injection d'AG à des rats entraîne l'aggravation de la fibrose tubulo-interstitielle dans un modèle de protéinurie expérimentale (Thomas 2002). In *vitro*, les AGL entraînent une apoptose des cellules épithéliales des tubules proximaux (Arici et al. 2003).

I.2.5 Obésité et maladie pancréatique

Dans les organes ayant peu de capacité de régénération comme le pancréas, la progression vers une défaillance d'organe est encore plus marquée. En effet, l'obésité pourrait s'accompagner aussi d'une accumulation de TG dans les ilots de Langerhans. Cette accumulation ectopique de lipides dans les cellules β pourrait être à l'origine d'une dérégulation de la sécrétion d'insuline.

II. Obésité et stress oxydatif

II.1. Définition du stress oxydatif

En condition physiologique, les systèmes biologiques produisent des radicaux libres ou espèces pro-oxydantes. Ces molécules sont indispensables pour certaines fonctions cellulaires, mais sont aussi très instables et peuvent rapidement causer des dommages tissulaires (Davies, Robinson, et Bevill 1995). Des systèmes de défense antioxydants (Schaufele, et Abdu 2006) existent afin de maintenir un niveau non cytotoxique des radicaux libres au sein de l'organisme en les dégradant ou en empêchant la formation de ces espèces fortement réactives.

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance prooxydant/ antioxydant en faveur des oxydants, entraînant des dommages cellulaires importants (Atamer et al. 2008). Ce déséquilibre peut être dû à une surproduction d'espèces pro-oxydantes (ROS), ou à un déficit en anti-oxydants. Des facteurs pro-oxydants environnementaux, tels que le tabac, l'alcool, la pollution ou la prise de médicaments peuvent également entraîner et/ou amplifier un stress oxydant (Valko, Morris, et Cronin 2005; Moller et Rice 2006).

Un excès d'espèces pro-oxydantes peut conduire à un affaiblissement des systèmes de défense antioxydants, mais également à l'activation de facteurs ou de gènes impliqués dans le développement de diverses maladies. En effet, le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses situations pathologiques, telles que les maladies inflammatoires (Feijóo et al. 2010; Rezaie, Parker, et Abdollahi 2007), les cancers (Edderkaoui et al. 2005; Brar et al. 2002), les maladies cardiovasculaires (Griendling et Alexander 1997), etc. Enfin, plusieurs études ont montré qu'il existe une relation entre divers marqueurs du stress oxydant et le degré d'obésité (Fernández-Sánchez et al. 2011; Furukawa et Horii 2004).

II.2. Les radicaux libres

Les espèces pro-oxydantes ou encore radicaux libres sont des molécules possédant au moins un électron célibataire (non apparié) sur leur orbitale externe. De manière conventionnelle, cet électron célibataire est représenté par « ° ». Ces radicaux sont très réactifs et instables (Kroonenberg 2000), car ils cherchent à « ré-apparier » leur électron à partir des molécules environnantes. En effet, ils participent à des réactions en chaîne pour former de nouveaux radicaux libres. La durée de vie d'un radical est d'autant plus courte et le radical d'autant plus réactif, qu'il a la possibilité de délocaliser son électron célibataire sur une autre molécule.

Les espèces radicalaires jouent un rôle essentiel dans un grand nombre de fonctions physiologiques, comme la phagocytose ou la régulation de la croissance et la signalisation cellulaire (Fridovich 1999). Cependant, lorsqu'elles sont en quantité trop importante, elles peuvent devenir cytotoxiques pour les cellules et entraîner l'oxydation des protéines (Headlam et Davies 2003), (Refsgaard, Tsai, et Stadtman 2000) et des lipides membranaires (Spiteller 2007) et/ou de l'ADN (Dalle-Donne et al. 2006; Danielsen et al. 2009).

Dans les systèmes biologiques, les radicaux libres les plus importants sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species ») et les espèces réactives de l'azote (RNS pour « reactive nitrogen species »).

La forme initiale des ROS, qui est obtenue par l'ajout d'un électron sur l'oxygène moléculaire (O_2) est l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$). Ce dernier peut ensuite être transformé en différents ROS secondaires, tels que le radical hydroxyle (HO°), peroxyde (ROO°), ou encore le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$) et l'hydroperoxyde organique ($ROOH$) qui ne sont pas des radicaux à proprement parler mais qui sont tout de même toxiques et capables de réagir pour former d'autres radicaux libres. Les RNS sont souvent représentés par le monoxyde d'azote (NO°) qui est formé à partir de la L-arginine, du radical guanidium et d'une molécule d'oxygène. Mis à part ses propriétés biologiques bien connues (Christopherson et Brecht 1997;Marín et Rodríguez-Martínez 1997), le NO° est capable de réagir avec l'oxygène pour donner des nitrates ou avec d'autres radicaux libres tels que l' $O_2^{\circ-}$ pour former des peroxy-nitrites ($ONOO^-$). Un récapitulatif des différents ROS et RNS est présenté dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Sun, 2009)

Espèces réactives d'oxygène (ROS)		Espèces réactives de nitrogène(NOS)	
Forme radicalaire	Forme non radicalaire	Forme radicalaire	Forme non radicalaire
Superoxide ($O_2^{\circ-}$), Hydroxyl (OH°), peroxy (RO_2°), alkoxy (RO°), hydroperoxy (HO_2°).	Hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid ($HOCl$), ozone (O_3), singlet oxygen (ΔgO_2), peroxy-nitrite ($ONOO^-$).	Nitric oxide (NO°), Nitrogen dioxide (NO_2°)	Nitrous acid (HNO_2), dinitrogen trioxide/tetroxide (N_2O_3/N_2O_4), nitronium (nitryl) ion (NO_2^+), peroxy-nitrite ($ONOO\ddot{y}$), alkyl peroxy-nitrite ($ROONO$), nitroxyl anion ($NO\ddot{y}$), nitrosyl cation (NO^+), nitryl chloride (NO_2Cl)

II.3. Mécanismes de production des dérivés de l'oxygène

II.3.1. Sources biologiques des espèces réactives de l'oxygène

Plusieurs stimuli extracellulaires peuvent être à l'origine de la production endogène des ROS (Finlay et al. 2000). Parmi eux, on peut citer les hormones comme l'insuline, les facteurs de croissance ou les cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumoral TNF- α pour (« Tumor necrosis factor-alpha »). Dans la cellule, les ROS sont produits par différentes enzymes telles que la NADPH oxydase (NOXs), la xanthine oxydase, les cyclooxygénases, les lipoxygénases, le cytochrome P450, la NO synthase endothéliale et les enzymes de la chaîne mitochondriale (Drummond et al. 2000; Wassmann, et Nickenig 2004). La contribution relative de chacune de ces sources au cours d'un stress oxydatif n'est pas encore tout à fait élucidée. Cependant, dans un contexte de maladies vasculaires, plusieurs études expérimentales et cliniques ont révélé que les NOXs représentent les sources principales de production des ROS au niveau vasculaire. Ils interviennent dans plusieurs pathologies associées à la dysfonction endothéliale comme l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète, l'obésité ou encore l'hypercholestérolémie (Hwang et al. 2003; Pierce et al. 2010; Thomas et al. 2003).

La famille des NADPH oxydases est représentée par cinq NOX (NOX1, 2, 3, 4 et 5) ainsi que par deux DUAL oxydases 1 et 2 (DUOX1 et 2) (Bedard, 2007). Toutes ces enzymes sont des enzymes transmembranaires qui réduisent l'O₂ en O₂^{•-} grâce au NADPH cytosolique et via un transfert d'électrons (Palet et al. 2000). Elles ont toutes six domaines transmembranaires, un site de liaison du NADPH, du NADH et du FAD à leur extrémité C-terminale, et quatre résidus histidine très conservés sur les 3^{ème} et 5^{ème} domaines transmembranaires. Toutes les NOXs présentent une similitude de structure et de fonction enzymatique entre elles. Cependant, chaque NOX a un modèle d'expression et un mécanisme d'action unique. La plupart d'entre elles requièrent l'assemblage d'autres sous unités, telles que p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, Rac et p40^{phox}, pour leur fonction.

L'activation de la NADPH oxydase implique deux types de phénomènes: la phosphorylation et la translocation à la membrane des sous-unités cytosoliques. En effet, suite à l'activation de la cellule, les composantes cytosoliques p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} sont phosphorylées et migrent vers la membrane pour s'associer aux facteurs membranaires gp91^{phox} et p22^{phox}. Parallèlement, la molécule Rac va échanger son GDP avec un GTP, se dissocier de son inhibiteur Rho-GDI, et migrer de façon indépendante vers la membrane. Le cytochrome b558

est ensuite activé par la p67_{phox}, par l'intermédiaire de son domaine d'activation (figure 3). La NADPH oxydase ainsi activée va utiliser le NADPH cytosolique pour réduire l'oxygène et produire de l'anion superoxyde (Paquet et al. 2000).

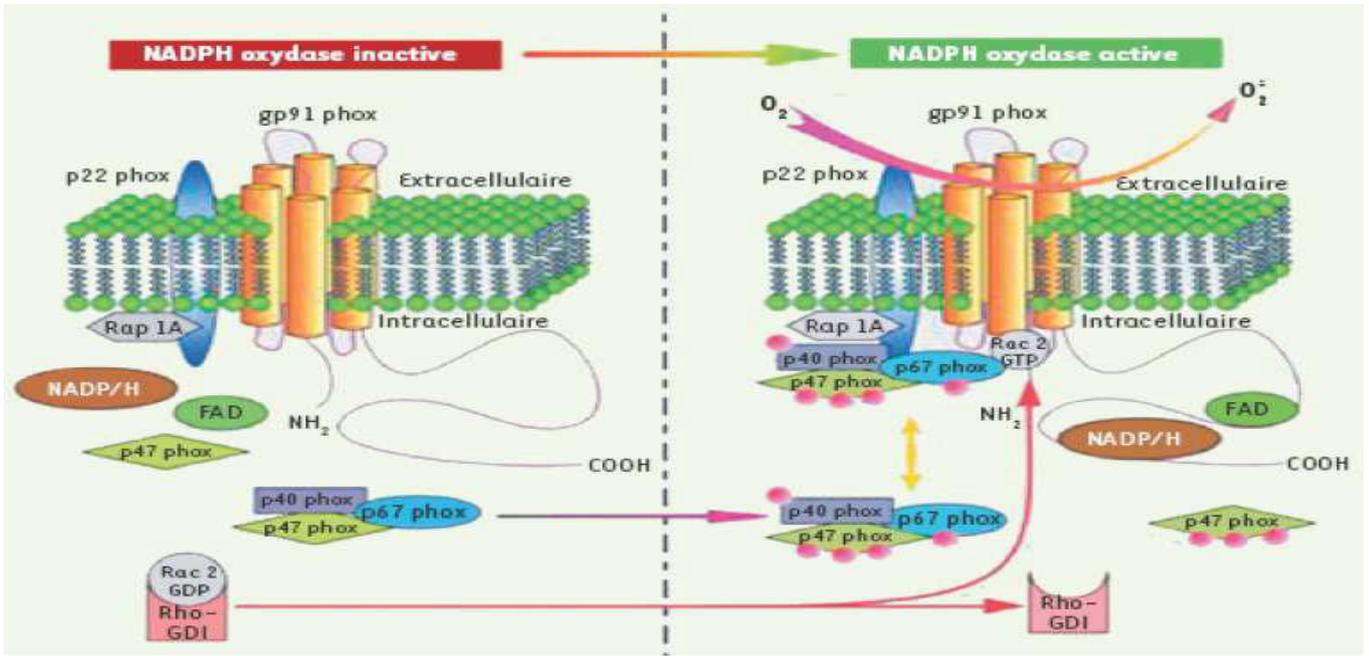


Figure 3: Représentation schématique de l'activation de la NADPH oxydase (DeLeo, 1996).

A la différence des NOXs, le complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale n'a pas pour fonction première de produire les ROS. Il existe au niveau de la membrane interne de la mitochondrie un système complexe de protéines qui produit, grâce à la réduction de l'oxygène, des molécules d'ATP qui, à leur tour, servent de source d'énergie pour la cellule. Cependant, suite à des fuites électroniques résultant d'imperfections de la chaîne respiratoire, une petite partie (0.4 à 4%) n'est pas correctement converti en (H₂O) et donne naissance à des ROS comme l'anion superoxyde O₂⁻ (Turrens 2003).

II.3.2. Sources biologiques des espèces réactives de l'azote

Parmi les radicaux libres impliquant un atome d'azote, on peut citer le monoxyde d'azote (NO°). Ce dernier est produit sous l'action des NO synthases qui sont des enzymes induites par l'oxygène. La figure 4 montre que cette production est obtenue par transformation de la L-arginine en L-citrulline en deux étapes : L'hydroxylation d'un azote du groupement guanidine de la L-arginine pour former un composé intermédiaire instable la Ng-OH-L-arginine qui se dégrade ensuite en L-citrulline et NO° (Darblade et al. 2000). Plusieurs NOS issues de gènes distincts et ayant des localisations différentes ont été décrites en fonction de

leur mode de synthèse (constitutive ou inductible), leurs propriétés catalytiques et leur mode de régulation (Dudzinski et al. 2006).

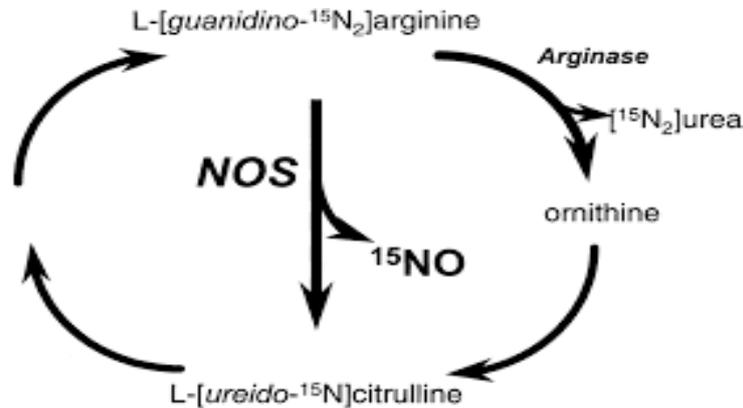


Figure 4: les étapes de production du monoxyde d'azote (NO°)

II.4. Mécanismes de défense contre les ROS

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est effectué par des systèmes antioxydants dont le rôle principal est de neutraliser et dégrader les radicaux libres. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont définis comme des substances qui, à faible concentration, retardent ou inhibent significativement l'oxydation du substrat oxydable (Mezzetti et al. 1990). Ils peuvent être divisés en deux groupes selon leur mode d'action : les antioxydants enzymatiques (ou primaires) et les antioxydants non-enzymatiques (ou secondaires).

II.4.1. Antioxydants primaires

Ce système est principalement composé des superoxydes dismutases (SOD), des catalases (CAT), des glutathions peroxydases (GPx) et des thiorédoxines (M. Higashi et Truhlar 2009). Parmi ces enzymes, les SOD représentent la première ligne de défense pour contrer les ROS, et ce sont les enzymes antioxydantes les plus importantes au niveau vasculaire (Y. Higashi et al. 2009; Wassmann, et Nickenig 2004). Chez les mammifères, la SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Même si les SODs sont considérées comme des protecteurs contre les ROS et ont pour objectif de neutraliser l' $\text{O}_2^{\circ-}$, elles peuvent également être sources de ROS à cause de leurs effets pro-oxydants par la catalyse de la dismutation des ions superoxyde en H_2O_2 toxique

(Fridovich 1995). Afin de neutraliser l' H_2O_2 , d'autres systèmes antioxydants, tels que la catalase (CAT) ou la glutathion peroxydase (GPx) sont nécessaires. La CAT est une molécule héminique de 220 kDa constituée de quatre sous-unités possédant chacune un groupement ferritoporphyrine. Elle neutralise l' H_2O_2 en formant de l' H_2O et de l' O_2 (Mates et Kirkpatrick 1999). Quant à la GPx est une enzyme tétramérique de 80 kDa possédant un atome de sélénium dans chacune de ses sous-unités. Elle élimine l' H_2O_2 en oxydant un glutathion et peut également transformer les peroxydes ROOH en acides gras hydroxylés.

La figure 5 simplifie l'interaction entre les antioxydants primaires et les différentes espèces pro-oxydantes.

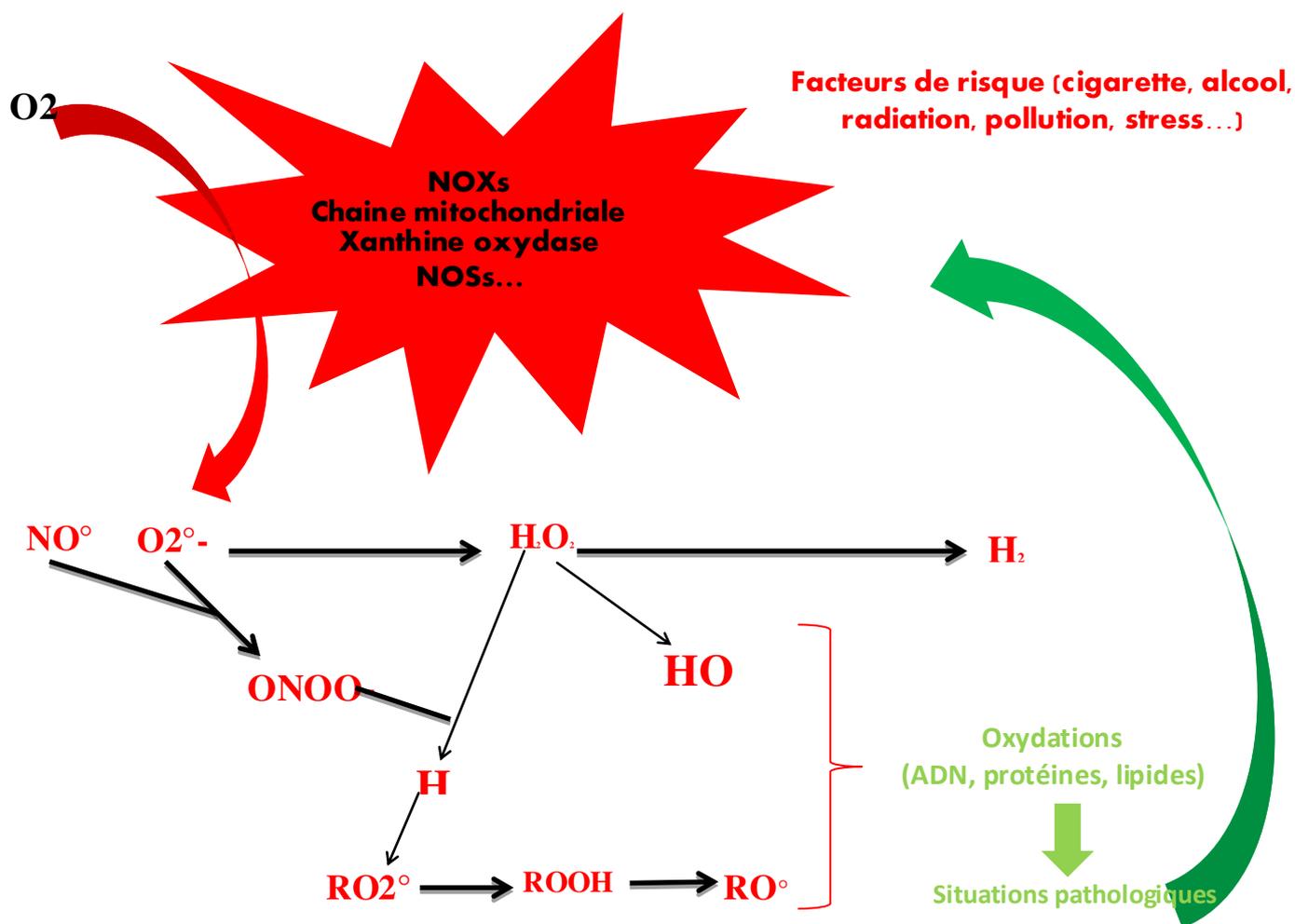


Figure 5: Interactions entre les ROS/RNS et les antioxydants primaires.

CAT: catalase; GPx : glutathion peroxydase ; HOCl : acide hypochloreux; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; NO° : monoxyde d'azote ; NOSs : NO synthases ; NOXs : NADPH oxydases ; OH° : radical hydroxyle ; ONOO- : peroxydite ; $\text{O}_2^{\circ-}$: anion superoxyde ; RO° : radical alkoyle ; ROOH : hydroperoxyde organique ; RO_2° : radical peroxyde ; SODs : superoxyde dismutases.

II.4.2. Antioxydants secondaires

Les antioxydants secondaires sont considérés comme piègeurs de radicaux libres non-enzymatiques. Contrairement aux enzymes, la plupart des antioxydants secondaires ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent donc être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie, on trouve les oligoéléments (cuivre, zinc, manganèse, fer, selenium), les polyphénols, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone (CoQ10), l'alpha tocophérol (ou vitamine E), l'acide ascorbique (ou vitamine C) et les caroténoïdes (Vertuani, 2004).

II.4.3. Principe de la supplémentation en antioxydants

Il existe un lien étroit entre la composition de notre alimentation et le statut antioxydant de l'organisme. En effet, un apport d'alimentation riche en fruits et légumes augmente les taux plasmatiques de certains antioxydants (George et al. 2013; Polidori et al. 2009). Cependant, on peut envisager une supplémentation directe en antioxydants lorsque notre alimentation ne suffit pas à enrichir les systèmes de défense antioxydant de l'organisme.

En effet, depuis plusieurs années, l'administration de composés antioxydants s'est révélée être une bonne stratégie de prévention contre de nombreuses pathologies. Il existe de nombreux types de supplémentation incluant celles avec des antioxydants secondaires tels que les vitamines et le sélénium (Derbeneva et al. 2012) mais aussi celles avec des antioxydants enzymatiques telles que la SOD ou la CAT (Clausen 2012) qui sont plus efficaces (grâce à leur plus grande vitesse d'action et leur besoin de renouvellement plus faible).

Contrairement à la plupart des médicaments qui sont administrés en traitement curatif, les antioxydants sont souvent considérés comme un traitement préventif. Vu que le stress oxydant précède souvent les effets plus néfastes de la pathologie, la prévention de l'installation des ROS se révèle efficace dans plusieurs maladies.

Il est aussi à signaler que les antioxydants ne sont pas, pour la plupart, des molécules pures, ils sont souvent plus bénéfiques avant l'installation pathologique.

Pour une supplémentation en antioxydants, plusieurs voies sont envisageables. En effet, la voie de l'injection est préférable pour obtenir un effet antioxydant plus rapide. Cependant, la supplémentation orale reste la voie la plus utilisée. Elle est considérée comme la voie la plus efficace grâce à la grande surface d'absorption que procure le tube digestif sans qu'elle soit invasive.

De nos jours, il est bien connu que les produits naturels comme beaucoup d'antioxydants, et particulièrement issus de plantes, sont bénéfiques pour la santé. Ils sont donc en général considérés comme des produits non toxiques et ayant beaucoup moins d'effets secondaires que les médicaments conventionnels. La législation concernant les produits naturels, établie par la FDA (« Food and Drug Administration »), est très exigeante à ce sujet. Cependant, certains produits naturels se sont avérés toxiques pour l'homme. Et certaines molécules, particulièrement les antioxydants, ayant des effets bénéfiques à faible dose peuvent également devenir néfastes avec des doses plus fortes (De Luca et al. 1996; Jain et al. 2012). D'où vient la nécessité de réaliser des tests de toxicité sur les produits naturels afin de vérifier qu'il n'y ait pas d'effet néfaste aux doses utilisées.

II.4.4. Supplémentation en antioxydants et obésité

Plusieurs études de recherche portant sur des rongeurs et des humains ont montré que, en cas d'obésité et de désordres liés au syndrome métabolique, il y a une augmentation du stress oxydant et une altération de la capacité antioxydante aussi bien au niveau des tissus que dans le plasma (Kocic et al. 2008). Il semble que le tissu adipeux et le cerveau sont particulièrement touchés par ce déséquilibre entre ROS et la défense antioxydante (Garrel et al. 2014). Il a été montré qu'il existe une boucle neuronale entre les tissus adipeux et le cerveau jouant un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie énergétique mais également dans des pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 (Lefebvre et al. 2010). Une supplémentation en antioxydants pourrait donc prévenir ce déséquilibre en faveur des ROS ainsi que les désordres métaboliques qui en découlent. Dans ce contexte, plusieurs études ont montré l'efficacité d'antioxydants sur la réduction de poids et leurs effets bénéfiques sur les désordres associés à l'obésité (Alizadeh et al. 2014; Ning et al. 2012). Par exemple, l'administration d'un inhibiteur de xanthine oxydase (NOX) réduit la production de ROS dans le tissu adipeux mais aussi la dérégulation de la sécrétion d'adipokines, l'hyperlipidémie, la stéatose hépatique et améliore le diabète de type 2 (Furukawa et al. 2004).

III. L'extrait de pépins et de peau de raisin (GSSE)

III.1. Composition du GSSE

Le GSSE est un extrait préparé à partir du raisin rouge *Vitis vinifera*, très riche en composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les anthocyanines, les catéchines et les stilbenes (resvératrol) qui sont distribués au niveau de la pulpe, des pépins, et des feuilles (Qin et al.

2010). Il possède des effets bénéfiques pour la santé. Son activité antioxydante est 15 fois plus importante que celle de la vitamine C ou de la vitamine E (Muaz et al. 2011). Cette propriété se manifeste par la capacité des polyphénols à piéger les ROS (les radicaux hydroxyles et peroxydes), à chélater les métaux, et à limiter la peroxydation des lipides (Qin et al. 2010).

III.2. Effets biologiques du GSSE

III.2.1. Effet antioxydant

Les polyphénols du raisin sont caractérisés par une activité antioxydante qui se manifeste par une élimination des radicaux libres, une inhibition de la peroxydation des lipides et une réduction de la formation des hydroperoxydes (Meyer et al. 1997; Saito, et Matsuki 1996).

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour évaluer les capacités antioxydantes des composés phénoliques issus de raisin ou de parties de raisin, telles que la méthode 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Odelola et Koza 1975). Des activités antioxydantes ont été également trouvées dans le vin, le jus de raisin et les extraits de différentes parties du raisin. La plus grande activité antioxydante a été trouvée dans les pépins de raisin, suivie de la peau alors que la chair possède l'activité antioxydante la plus faible (Pastrana-Bonilla et al. 2003).

Pinelo et al. 2005 ont étudié l'impact du solvant sur l'activité antioxydante de la catéchine, du resvératrol et des extraits de raisin dissous respectivement dans l'éthanol, le méthanol et l'eau. L'activité antioxydante étant maximale dans l'éthanol, puis dans le méthanol. Elle est la plus faible lorsqu'il s'agit de l'eau comme solvant, suggérant ainsi l'utilisation de l'éthanol comme meilleur solvant des extraits polyphénoliques.

Les caractéristiques antioxydantes des composés phénoliques sont principalement attribuées à leur pouvoir à éliminer les radicaux libres, à leurs propriétés de chélation de métaux, ainsi qu'à leurs effets sur les voies de signalisation cellulaire et sur l'expression des gènes (Soobrattee et al. 2005; Dell et O'Kelley 2005). Arora et al. (1998) ont montré que les flavonoïdes possèdent une capacité antioxydante plus élevée, contre la peroxydation induite par les ions métalliques, que par celle induite par le radical peroxyde (ROO⁻). Cette réaction génère des radicaux phénoxydes stables et qui permettent de couper la chaîne de réaction (Yoshimura et al. 2003).

III.2.2. Effet anti-inflammatoire

Les composés phénoliques dans les raisins, surtout dans les pépins de raisin, ont montré des effets anti-inflammatoires chez le rats, la souris et l'homme (Chacón et al. 2009). (Bralley et

al. 2007) ont montré que des extraits de raisin (peau et pépin) inhibent l'inflammation de l'oreille chez la souris, la formation d'oedème et l'infiltration des leucocytes polyonucl  aires.

L'inhibition ou la réduction de l'expression des gènes des cytokines semble être la principale voie par laquelle l'extrait de raisin exerce son effet anti-inflammatoire (Terra et al. 2009; Li et al. 2001). En effet, suite à une inflammation, le prétraitement aux extraits de procyanidines de pépins de raisin diminue la production d'IL-6 et de MCP-1, et provoque l'augmentation des protéines anti-inflammatoires telles que les adipokines et les adiponectines. Ces résultats montrent que l'extrait de pépins de raisin (grape seed extract « GSE ») pourrait moduler l'expression des gènes des adipokines et des cytokines lors d'un processus inflammatoire (Chacon et al. 2009).

(Terra et al. 2009) ont rapporté que les extraits de procyanidines de pépins de raisin diminuent l'expression de la protéine C-réactive (CRP) dans le plasma de rat ayant subi une alimentation riche en graisses, ainsi que l'IL-6 et TNF- α qui ont été détectées dans le tissu adipeux mésentérique. D'autres recherches ont démontré que l'expression des ARNm de la CRP diminue dans le foie et dans le tissu adipeux mésentérique. Suggérant ainsi que les troubles métaboliques et inflammatoires induits par les taux élevés des lipides ont été considérablement inhibés.

III.2.3 Effet anti-vieillessement

Les polyphénols du GSSE et en particulier le r  sveratrol, stimule l'expression d'une famille de gènes, les sirtuines. Ces gènes codent pour une classe d'enzymes « les déacétylases » qui ralentissent le vieillissement en agissant sur de nombreux mécanismes cellulaires, tels que la réparation de l'ADN et la résistance au stress oxydatif.

Selon une étude conduite à Harvard Medical School, le r  sveratrol active un gène de longévité (Sir2) dans certaines souches de levure et permet d'accroître leur espérance de vie de 70%. Il agit de façon analogue à la restriction calorique (seule méthode scientifiquement prouvée pour accroître la longévité) par l'activation des gènes SIR (Chen et al. 2006).

Des chercheurs de Boston ont aussi réussi à mettre en évidence les effets de ce polyphénol chez les souris. Ils ont montré que les effets néfastes d'un régime hypercalorique sur la longévité et la santé des souris sont neutralisés par le r  sveratrol. Par rapport aux souris qui n'en reçoivent pas, celles qui traitées au r  sveratrol sont plus sensibles à l'insuline. Elles ont aussi un nombre plus important de mitochondries, un facteur de vitalité et de longévité (Baur et Sinclair 2006).

III.2.4. Effet anti-cancéreux

Plusieurs travaux ont montré que les extraits de raisin et ses produits possèdent une activité anticancéreuse. En effet, (Hudson et al. 2007), ont trouvé que l'extrait de peau de raisin induit, à des taux élevés, l'apoptose des lignés de cellules tumorales de la prostate. De même l'extrait de pulpe inhibe l'activité des métalloprotéinases 2 et 9, qui dégradent la matrice extracellulaire et permettent de détacher les cellules cancéreuse (Lazzè et al. 2009). De plus les composés phénoliques du jus de raisin diminuent significativement la formation d'adduits d'ADN chez des rats atteint de cancer (Jung et al. 2006) et inhibent la synthèse de l'ADN dans les cellules du cancer du sein (Singletary 2003). Les extraits de peau de raisin agissent sur la régulation de l'apoptose des cellules via la phosphatidylinositol 3-kinase-Akt et la MAP kinase. Ils inhibent la transcription Akt, et activent les protéosomes (Hudson et al. 2007).

III.2.5. Organes protecteurs

III.2.5.1. Protection du cœur

En plus du pouvoir antioxydant des extraits de raisin, les extraits de pépins de raisin (5-50 mg /mL) provoquent la réduction de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire ainsi que la génération de l'anion superoxyde. Ces extraits seraient plus efficaces que le resvératrol pur (Olas et al. 2008; Shanmuganayagam et al. 2007) ont tenté d'étudier le potentiel des composés phénoliques à inhiber l'agrégation plaquettaire induite par l'hypercholestérolémie chez le lapin. Le jus de raisin (225 ml / jour), induit dans le cas d'un régime hypercholestérolémique pendant 96 jours, une parfaite diminution de l'agrégation plaquettaire et le développement de l'athérome a été diminué de près de 30% par rapport au groupe témoin. Les stries lipidiques aortiques de hamster diminuent également d'une manière significative chez les sujets traités respectivement par la catéchine (84%), la quercétine (80%) et le resvératrol (76%) par rapport à ceux des animaux témoins (Auger et al. 2005).

(Neri et al. 2005) ont montré que les anthocyanes du vin et de la peau de raisin inhibent l'activité phosphodiesterase-5, ce qui réduit le risque de maladies cardiovasculaires par vasorelaxation des vaisseaux. Falchi et al. (2007) ont réalisé des ischémies cardiaques sur des cœurs isolés de rats pendant 30 min suivies de deux heures de reperfusion, et ont constaté que les lésions ischémiques ont significativement diminué chez les rats prétraités pendant 30 jours avec des extraits de la chair et la peau des raisin. Des résultats similaires ont été également obtenus avec l'utilisation de l'extrait de la chair et de peau de raisin.

III.2.5.2. Protection du cerveau

Les différents extraits de raisins possèdent en plus effets décrits ci-dessus, des effets protecteurs sur le cerveau. En effets, Jiang et al. (2009) ont trouvé que la consommation de l'extrait de pépins pendant 6 mois, prévient l'accumulation du bêta-amyloïde au niveau du cerveau et diminue son taux au niveau du plasma chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer. Il prévient aussi, selon les travaux de Wang et al. (2010), la formation d'oligomère de bêta-amyloïde et la détérioration des capacités cognitives chez ce même type de souris. De plus, d'autres études ont montré que l'extrait de pépins de raisins protège le système nerveux central contre l'accumulation des dommages oxydatifs de l'ADN causés par le vieillissement (Balu et al. 2006; Bagchi et al. 1998) ont démontré que l'extrait de pépins de raisin diminue la lipoperoxydation et la fragmentation de l'ADN au niveau du cerveau. Le GSE aurait également, des effets anti-âge démontré par Balu et al. (2006) qui ont trouvé que le GSE stimule les enzymes antioxydantes chez les rats âgés au niveau de la moelle épinière, du cortex cérébral, du striatum et de l'hippocampe et augmente aussi les systèmes antioxydants non enzymatique tels que le glutathion réduit, la vitamine C et la vitamine E. Le GSE réduirait ainsi par ces mécanismes, la peroxydation de lipides et les dommages cellulaires liés aux radicaux libres au niveau du système nerveux central chez les rats âgés.

III.2.5.3. Protection des reins

Les polyphénols du GSSE jouent un rôle important en stimulant le système antioxydant, puisqu'ils se comportent comme extracteurs de ROS, chélateurs de métaux et modulateurs d'enzymes (Pietta et al. 1998). En accord avec cette propriété, il a été démontré que le resvératrol supprime la protéinurie, l'hypoalbuminémie et l'hyperlipidémie induites chez le rat par un antisérum rénal (Nihei, 2001). En outre, des études ont aussi prouvé les effets néphroprotecteurs pour d'autres polyphénols comme la quercétine (Kitamura et al. 2000) et la rutine (Shimoi et al. 1997). D'autre part, on a également constaté que le traitement avec le GSSE protège de manière significative contre la néphrotoxicité induite par le cisplatine. Dans une étude faite chez des rats diabétiques, le GSSE aurait un effet néphroprotecteur par des mécanismes liés à ses capacités antioxydantes et à diminuer le taux du NO ainsi que l'activité des NOS (Wang et al. 2006).

Le resvératrol protégerait également les cellules rénales contre les dommages de l'ischémie-reperfusion, en stimulant la production du NO.

III.2.5.4 Protection du foie

Un effet hépatoprotecteur par le GSSE contre les dommages oxydatifs a été prouvé suite à une ligature du canal cholédoque chez le rat. L'effet du GSSE comporte probablement l'inhibition de l'infiltration de neutrophiles ainsi que la peroxydation lipidique (Dulundu et al. 2007). Dans une autre étude réalisée sur les hépatocytes de rats, le GSE protégerait la membrane cellulaire contre les dommages oxydatifs induits par l'adryamicine, en atténuant l'oxydation des protéines et des lipides. La perturbation des niveaux d'ATP et de GSH par l'adryamicine a été corrigée à l'aide du GSSE (Valls-Belles et al. 2006). Chez la souris, les proanthocyanidines sont capables d'augmenter l'expression de la Bcl-xL diminuant ainsi l'effet de l'acétaminophène qui induit des dommages au niveau de l'ADN, l'apoptose et la nécrose des hépatocytes (Ray et Chakrabarti 1999). D'autre part, le GSSE induit l'expression du CYP7A1 dans le foie, suggérant une élimination accrue du cholestérol par la voie des acides biliaires.

IV. La protéomique

IV.1. Définition

Le protéome est un terme désignant l'ensemble des protéines d'un organite, d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à un temps donné (Wilkins et al. 1996). Les protéines sont constituées d'un assemblage d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Un acide aminé est constitué d'un squelette hydrocarboné possédant un groupement amine (-NH₂), un groupement carboxylique (-COOH) et une chaîne latérale. En protéomique, les échantillons étudiés peuvent être de différentes natures et représenter un protéome entier (organisme, cellule), un sous-protéome (organite, compartiment sub-cellulaire, phosphoprotéome) ou encore un complexe protéique, mais ils sont toujours constitués de protéines en mélange. Leur complexité est plus ou moins importante. Elle peut varier d'une centaine de protéines s'il s'agit de complexes protéiques purifiés, à plusieurs milliers voire dizaines de milliers de protéines dans le cas de protéomes entiers de mammifères. L'analyse protéomique doit donc être capable d'identifier un maximum de protéines pour couvrir et caractériser au mieux le protéome étudié.

Le concept de la protéomique a connu son véritable point de départ en 1975 quand O'Farrell a pu séparer 1100 composés protéiques par électrophorèse bidimensionnelle chez *Escherichia Coli* (O'Farrell 1975). De même et à la même période, Klose et Sheele ont séparé les protéines de la souris et du cochon de Guinée par la même technique (Scheele 1975). Néanmoins à cette époque là, les limites de la technologie ne permettaient pas d'identifier les

protéines et donc, l'électrophorèse bidimensionnelle n'était qu'une méthode descriptive. C'est le développement simultané des techniques de séparation des protéines et des peptides et leur analyse par spectrométrie de masse qui ont permis l'essor de la protéomique. Il faut néanmoins souligner que les grandes performances de cette approche reposent sur l'ensemble des données acquises en génomique couplées au développement simultané de différentes techniques allant de la préparation des échantillons (fractionnement, gel d'électrophorèse, chromatographie liquide...) aux analyses bioinformatiques (banque de données génomique et protéique) tout en passant par la spectrométrie de masse.

Depuis 1995, le nombre de publications croît d'une manière exponentielle en protéomique : on peut dénombrer plus de 62900 articles publiés en 2013.

Contrairement au génome, le répertoire des protéines présentes ainsi que leur abondance varient selon le type de cellules, l'environnement et l'activité cellulaire. Les protéines résultent de la transcription puis de la traduction des gènes. Ces chaînes polypeptidiques peuvent subir des modifications post-traductionnelles non détectables par la seule analyse du génome ou des transcrits des gènes (transcriptome). Ces modifications post-traductionnelles sont des modifications chimiques réalisées le plus souvent par une enzyme, entraînant notamment un changement de la fonction de la protéine, de sa localisation cellulaire, des cascades de signalisation. Ces modifications interviennent au cours de divers processus comme par exemple la synthèse protéique, la prolifération, le stress oxydatif ou encore l'apoptose.

La protéomique désigne l'étude de la structure, des fonctions et de l'expression des protéines, ainsi que les interactions protéines-protéines. Un objectif majeur de l'analyse protéomique vise à identifier les marqueurs caractéristiques d'un phénomène physiologique ou d'un processus cellulaire. Avec les progrès réalisés ces dernières années en bioinformatique et en spectrométrie de masse, la protéomique est en plein essor pour étudier les biomarqueurs. Le nombre de publications par an dans le domaine de l'identification de biomarqueurs protéiques (mots clés « biomarker » « proteomic » dans la base de données NCBI Pubmed) est passé de 14 en 2000 à 1291 en 2012.

A l'heure actuelle, le décodage du génome humain est constitué de 22000 gènes. La transcriptomique étudie l'expression globale des gènes. Mais l'analyse des transcrits n'est pas suffisante : les niveaux d'ARNm exprimés (acides ribonucléiques messager) ne corrèlent pas toujours avec les niveaux protéiques (Gygi et al. 1999). La protéomique est donc différente mais complémentaire de la génomique et la transcriptomique (figure 6). Les protéines ne sont

pas isolées dans les cellules, elles interagissent avec d'autres facteurs: On parle donc d'interactomique. Quant à la métabolomique, elle étudie l'ensemble des métabolites d'une cellule (sucres, lipides...).

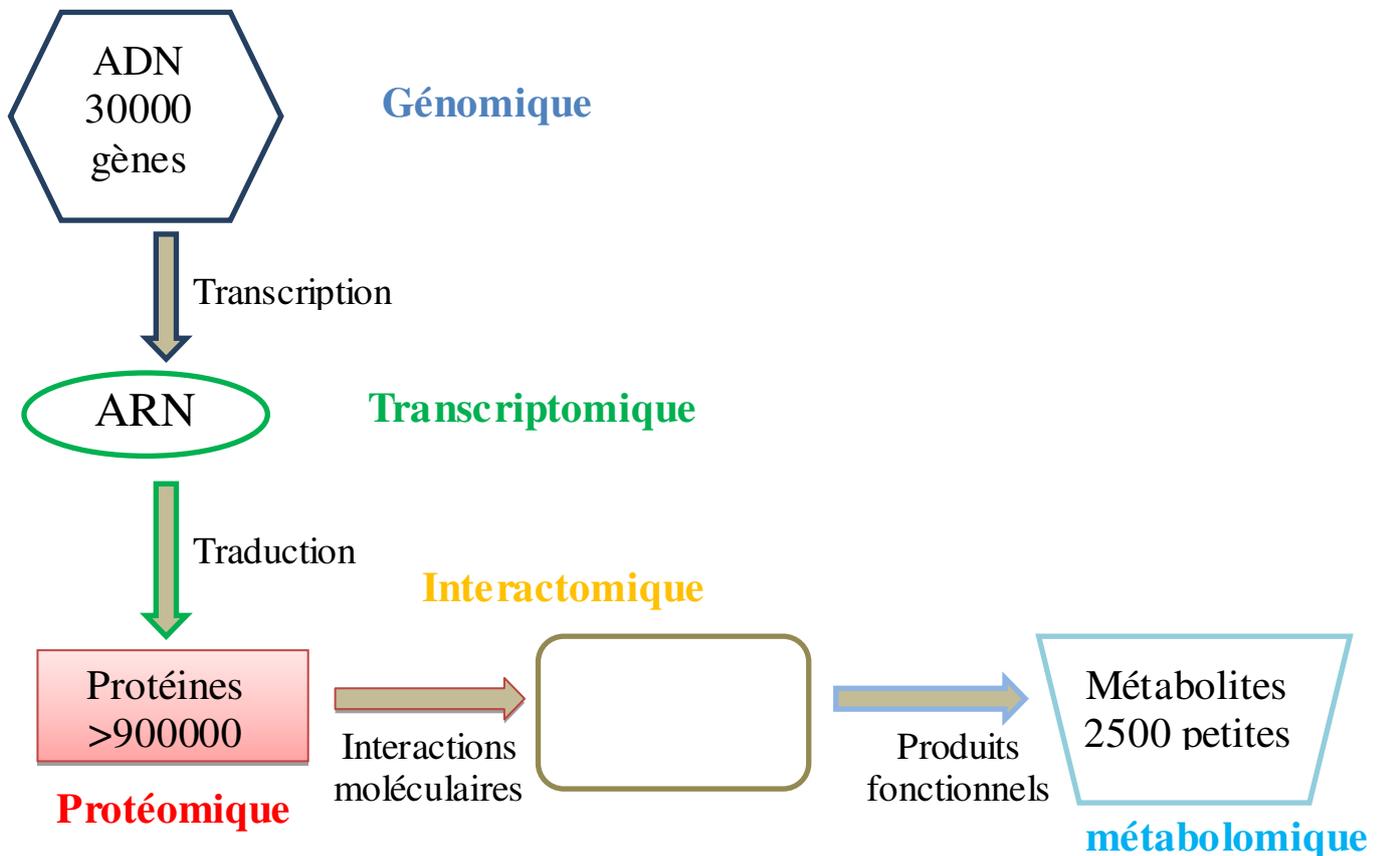


Figure 6 : Les « Omiques »

IV.2. Démarche protéomique

Dans sa version originale, la préparation de l'échantillon est considérée comme la première étape de l'analyse protéomique. C'est l'étape la plus importante. Il s'agit d'extraire, solubiliser et séparer les protéines contenues dans l'échantillon étudié. Dans un design plus récent, les échantillons sont analysés au niveau peptidique ce qui nécessite une étape de digestion enzymatique préalable du mélange protéique. Dans ces deux cas de figure, les peptides sont séparés par des méthodes électrophorétiques ou chromatographiques (figure 7). Il s'ensuit une analyse par spectrométrie de masse (SM) permettant l'identification des protéines. L'exploitation des spectres se fait ensuite grâce à des outils de bioinformatiques très spécialisés. A cette démarche classique peut s'ajouter une étape de quantification relative ou absolue, avec ou sans marquage des échantillons protéiques ou peptidiques. Suivant la

méthode de quantification utilisée, elle peut avoir lieu en amont ou en aval de l'étape de spectrométrie de masse.

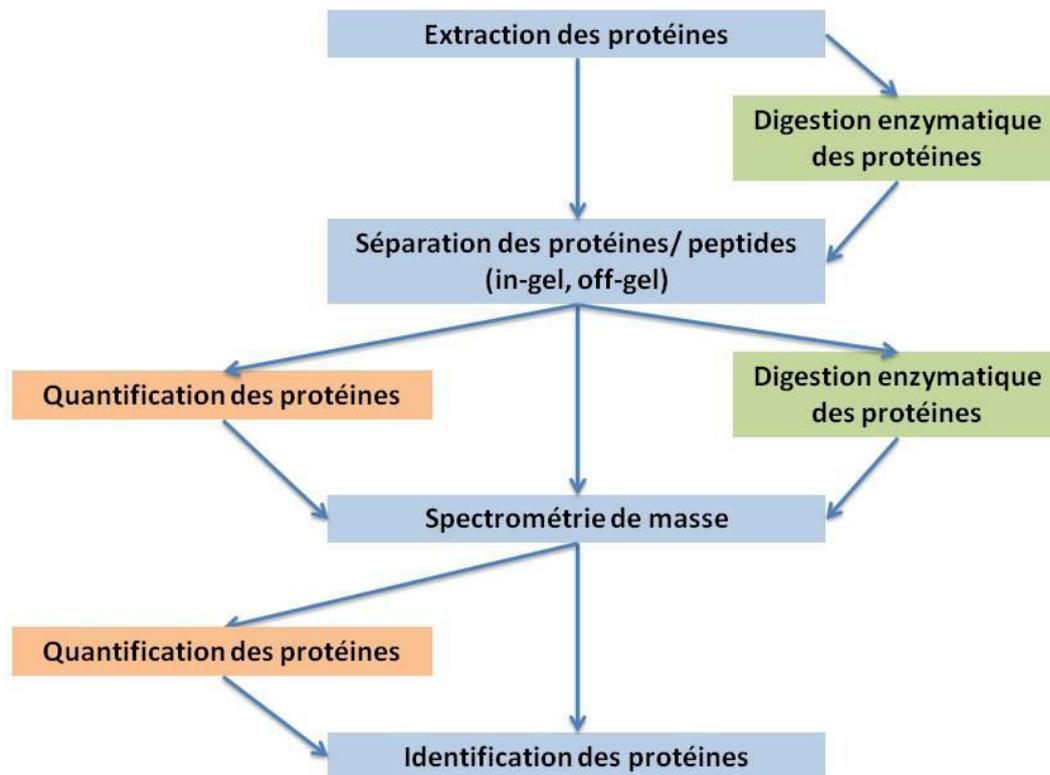


Figure 7: Schéma classique d'une démarche protéomique orientée vers l'analyse de biomarqueurs

➤ Séparation des protéines et des peptides

Une approche référencée « shotgun » consiste à étudier le protéome complet d'un échantillon biologique (cellule, tissu, fluide) en une seule expérience (Liu, Sadygov, et Yates 2004). Selon la nature de l'échantillon et l'objectif de l'analyse, les protéines extraites peuvent ensuite être fractionnées (par exemple sur gel 1D SDS-PAGE), des protéines spécifiques peuvent être enrichies à partir de l'extrait (analyse de sous-protéomes ou de complexes protéiques), ou l'extrait total peut être analysé. La principale difficulté est la complexité des échantillons analysés. En présence de protéines très abondantes, il est très difficile de détecter les protéines de très faibles concentrations (Anderson et Jennifer 2002). L'analyse de peptides tryptiques est techniquement beaucoup plus simple que celle des protéines entières. Cependant, comme chaque protéine digérée par la trypsine produit de nombreux peptides (une cinquantaine en moyenne), la complexité de l'échantillon est considérablement augmentée.

Pour faire face à celle-ci, le mélange peptidique est séparé sur une chromatographie liquide (LC) en phase inverse avant d'être injecté dans le spectromètre de masse. Cette étape de fractionnement permet donc de décomplexifier l'échantillon pour couvrir et caractériser au mieux le protéome étudié. Cette étape de séparation est primordiale dans une approche protéomique et varie selon la méthode de quantification adoptée.

a) Méthodes in-gel

Dans le cadre d'une analyse protéomique, l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) occupe une position centrale entre la préparation de l'échantillon et l'analyse par spectrométrie de masse. Développée en 1975 (O'Farrell 1975) et constamment améliorée (Anderson 2002), l'électrophorèse bidimensionnelle combine deux principes de séparation successives : la première se fait selon le point isoélectrique de la protéine (pI) appelée isoélectrofocalisation (IEF) tandis que la seconde orthogonale s'effectue en condition SDS-PAGE c'est-à-dire selon les masses moléculaires (MW) des protéines (figure 8). Ainsi, les protéines focalisées dans la même zone de pH sont ensuite séparées selon leur masse moléculaire. De cette manière une séparation des protéines aux propriétés proches de mélanges protéiques complexes serait possible avec une grande résolution.

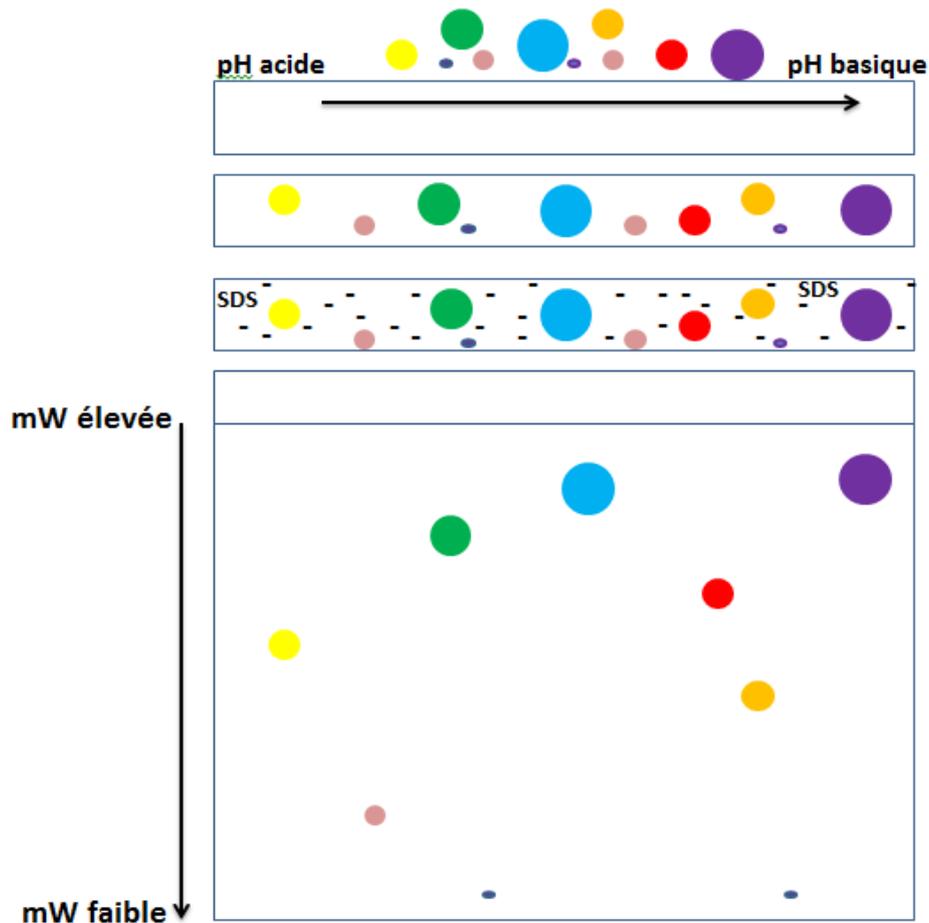


Figure 8: Schéma de la 2-DE

La première dimension (focalisation isoélectrique) sépare les protéines dans un gel d'acrylamide dans lequel règne un gradient de pH. Les protéines sont des composés amphotères, c'est à dire chargés positivement et négativement. Sous l'effet d'un gradient électrique, les protéines vont migrer dans un gradient de pH dans un gel d'acrylamide (Righetti et Bossi 1997). Le pI d'une protéine correspond au pH pour lequel les protéines deviennent neutres et vont stopper leur migration le long du gradient de pH. C'est une méthode devenue très fiable et reproductible, notamment par l'utilisation de bandelettes à gradient de pH immobilisé (Righetti 1989).

La seconde dimension est une électrophorèse classique SDS-PAGE, lors de laquelle les protéines sont séparées uniquement selon leur masse moléculaire. La présence de sodium dodecyl sulfate (SDS), un détergent anionique uniformise la charge de toutes les protéines et l'application d'un champ électrique permet la migration des protéines à l'intérieur du gel réticulé. Ce gel est réalisé à l'aide d'acrylamide et d'un agent réticulant, le bisacrylamide (N, N méthylène-bisacrylamide). La polymérisation nécessite l'ajout du persulfate d'ammonium,

l'initiateur qui forme spontanément des radicaux libres au niveau des doubles liaisons C-C de l'acrylamide et de l'agent réticulant. Pour que la polymérisation se fasse de façon rapide et fiable, il est nécessaire d'ajouter un catalyseur, le tetramethylethylenediamine (TEMED).

Pour obtenir une carte 2D de bonne qualité, différents prétraitements doivent être effectués. Le but de ces opérations étant d'atteindre une bonne focalisation et un niveau de reproductibilité satisfaisant.

- Solubilisation : les surfactants par leur caractère amphiphile favorisent la solubilisation des protéines les plus hydrophobes. Le CHAPS est un détergent non-ionique qui ne perturbe pas la première étape de l'électrophorèse bidimensionnelle.
- Dénaturation : les agents chaotropes (l'urée et la thiourée) détruisent la structure tertiaire des protéines (destruction des liaisons H).
- Réduction : des agents réducteurs (DTT...) participent également à la dénaturation en réduisant les ponts disulfures à l'origine de la stabilité des édifices protéiques.
- Alkylation : les groupements thiol des cystéines sont alkylés de façon irréversible afin d'éviter leur réoxydation.

Plusieurs techniques de détection post-électrophorétiques sont actuellement présentes sur le marché. Ainsi, parmi ces techniques, les plus connus sont la coloration au bleu de Coomassie (Neuhoff et al. 1988), au nitrate d'argent (Rabilloud 1990) ou par fluorescence (Tokarski et al. 2006). Cependant, il est important de vérifier la compatibilité des colorants utilisés avec l'analyse par spectrométrie de masse choisie (White et al. 2004): tel est le cas de la coloration par fluorescence. La coloration à l'argent est plus sensible que celle au bleu de Coomassie. La détection y est de l'ordre de ng mais propose une gamme dynamique restreinte.

Plus récemment, la coloration aux fluorochromes (Sypro Ruby, Sypro Orange,...) est considérée comme la méthode la plus sensible. Son potentiel de détection rend son utilisation idéale pour l'analyse d'un protéome tant d'un point de vue dynamique que quantitatif (Gygi et al. 2000; Shaw et al. 2003) (figure 9).

Cependant, cette méthode s'avère coûteuse nécessitant des scanners spécifiques (Chakravarti et al. 2010). Les protéines peuvent être également visualisées par autoradiographie après marquage radio-isotopique de l'échantillon (Link et al. 1999). Enfin, les protéines peuvent être révélées après transfert du gel sur des membranes de nitrocellulose ou de polyvinylidène

difluorure :PVDF, (Burnette 1981a), à l'aide d'anticorps spécifiques liés à une enzyme émettant un signal photométrique ou colorimétrique.

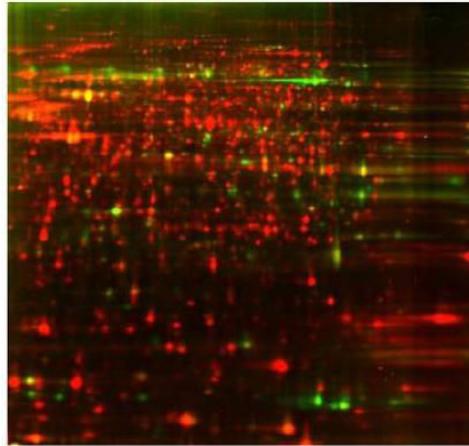


Figure 9: Carte protéomique de deux échantillons marqués à l'aide de 2 fluorochromes différents : Cyanine3 et Cyanine5 (Source GE Healthcare).

Avantages et inconvénients :

Cette technique a révolutionné le domaine de la protéomique puisqu'elle permet de séparer un nombre important de protéines (forte résolution) tout en étant très sensible. La 2-DE s'avère très sensible et permet de détecter jusqu'à 5 fmol de protéines (Viswanathan et al 2006) et jusqu'à 2000 protéines par carte protéomique. Cependant, cette technique longue et délicate à mettre en œuvre présente des limites qui lui sont propres. Les protéines les plus lourdes et les plus légères ne sont pas résolues, la gamme d'étude de pI est limitée (Chen et al. 2006); seules les protéines solubles et relativement abondantes pourront être étudiées. Ainsi, les mélanges trop complexes peuvent poser problèmes (Stasyk et Huber 2004). Il est également difficile d'automatiser cette méthode, relativement chronophage. Afin de fractionner au maximum l'échantillon protéique, d'autres approches ont été développées, sans avoir recours au gel d'acrylamide.

b. Méthodes off-Gel

Face au très grand nombre de peptides digérés à la trypsine, des approches hors gels ont été mises en place permettant d'obtenir directement les différentes fractions de l'échantillon sous forme liquide avant d'être injectées au spectromètre de masse.

b.1. La chromatographie en phase liquide LC

C'est la technique de choix pour la séparation de mélanges peptidiques grâce à sa résolution, sa flexibilité et ses possibilités de couplage direct au spectromètre. Il s'agit d'une séparation

des molécules entraînées par une phase mobile à travers une phase stationnaire. En protéomique, les molécules séparées par chromatographie liquide sont, le plus souvent, des peptides obtenus après digestion des protéines par une enzyme protéolytique (trypsine, pepsine...). Suivant la phase stationnaire utilisée, différents types de chromatographie sont disponibles : phase inverse, échange d'ions, exclusion stérique et affinité. Les colonnes chromatographiques classiques utilisées lors d'une approche protéomique sont des colonnes en phase inverse. Elles permettent la séparation des peptides selon leur hydrophobicité et leur taille. La séparation est effectuée grâce à un gradient d'éluant qui met en jeu une variation continue de l'hydrophobicité de l'éluant (mélange eau/acétonitrile/acide généralement), compatible avec une infusion directe dans la source du spectromètre. Au cours de ce gradient chromatographique, les peptides sont retenus dans la colonne pendant un certain temps selon leur hydrophobicité puis seront élués à un temps de rétention (RT) donné sous forme d'un pic chromatographique détecté par le spectromètre de masse. Pour que le système chromatographique soit compatible et efficace, les colonnes ont été miniaturisées (Davis et al. 1995). L'utilisation de la LC permet de diminuer l'effet de suppression d'ions, où le signal d'un ion majoritaire supprime l'autre d'un ion minoritaire. Ceci permet d'augmenter la gamme dynamique observable.

Selon le cas d'étude, plusieurs étapes de chromatographie peuvent être associées et sont retrouvées dans la littérature protéomique sous l'appellation *Multidimensional Protein Identification Technology* : MudPIT (Wolters, Washburn, et Yates 2001). Ces stratégies peuvent être constituées d'une première séparation effectuée sur une colonne échangeuse d'ions et d'une seconde effectuée sur une colonne phase inverse.

b.2. Electrophorèse capillaire

C'est une technique complémentaire des méthodes chromatographiques qui permet la séparation d'un grand nombre de molécules selon leurs propriétés électrophorétiques sous l'action d'un champ électrique (Jorgenson et Lukacs 1981). Si les premiers développements de l'électrophorèse capillaire ont été réalisés dans des laboratoires de recherche, cette technique fait aujourd'hui son entrée au laboratoire de biologie clinique. En effet, son pouvoir de séparation remarquable, sa rapidité, ses applications potentielles et son automatisation en font une alternative performante par rapport à d'autres méthodes souvent consommatrices de temps. Sa versatilité permet de l'utiliser pour la séparation et la quantification de nombreuses molécules biologiques aussi variées que les protéines, les lipoprotéines, les acides nucléiques

ou des molécules de petite taille telles que les acides aminés, les acides organiques et les médicaments ou les toxiques (Blessum et al. 1999).

b.3 Système de fractionnement OFFGEL

OFFGel est un système d'électrophorèse préparative pour fractionner des échantillons complexes, séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI), et les récupérer avec d'excellents rendements notamment pour analyse LC/MS. Cette stratégie de séparation a démontré son efficacité et sa reproductibilité pour des mélanges de peptides (Hörth et al. 2006). Pour ce faire, un dispositif composé de multiples micro-puits est déposé sur un gel dans lequel règne un gradient de pH (figure 10). Les échantillons peptidiques sont mélangés à un tampon contenant des ampholytes et sont déposés dans chaque micro-puits. Sous l'effet d'un champ électrique, les peptides vont diffuser à travers le gel et les phases liquides des différents compartiments pour atteindre le micro-puits où règne un pH correspondant à leur pI. Les fractions liquides contenues dans chaque puits peuvent alors être analysées individuellement.

Une étude récente a d'ailleurs montré la compatibilité fonctionnelle de la séparation OFFGEL avec une méthode de quantification par marquage isotopique (iTRAQ) des échantillons, ainsi que l'importance d'un fractionnement préalable des échantillons complexes pour les études protéomiques quantitatives (Chenau, 2008).

Caractéristiques et avantages clés :

- Préparateur de protéine selon leur pI résolution 0.1-0.6 pH capacité du μg au mg jusqu'à 16 échantillons/run
- Récupération des protéines en solution/facilite le transfert en LC/MS
- Augmente sensiblement le nombre de protéines identifiées par LC/MS



Figure 10: Système de fractionnement 3100 OFFGEL® (d'après Agilent technologies).

IV.3. Spectrométrie de masse et Protéomique

IV.3.1. Principe de la spectrométrie de masse

Depuis 1980, la spectrométrie de masse a joué un rôle important dans l'analyse d'échantillons biologiques. C'est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Classiquement, l'identification des protéines exige la détermination partielle ou totale de leurs séquences par la méthode d'Edman (Swank et Munkres 1971) mais celle-ci est limitée à l'étude des polypeptides purifiés et non bloqués au niveau du N-terminal. De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Le spectromètre de masse est constitué de trois modules. Une source d'ionisation, un analyseur en masse (m/z) et un détecteur de courant d'ions (figure 11). Les molécules à analyser sont, dans un premier temps, ionisées et amenées en phase gazeuse au niveau de la source. Les ions produits sont ensuite séparés selon leur rapport m/z puis collectés par le détecteur qui quantifie leur intensité et amplifie le signal. Ces dernières étapes s'effectuent dans un vide poussé afin d'éviter toute collision entre les ions et les molécules de gaz. Après la détection, un système informatique permet le traitement des données et génère un spectre de masse reflétant la variation du courant ionique observé en fonction du rapport m/z et permettant ainsi la détermination de la masse moléculaire des espèces ionisées (Domon et Aebersold 2006a).

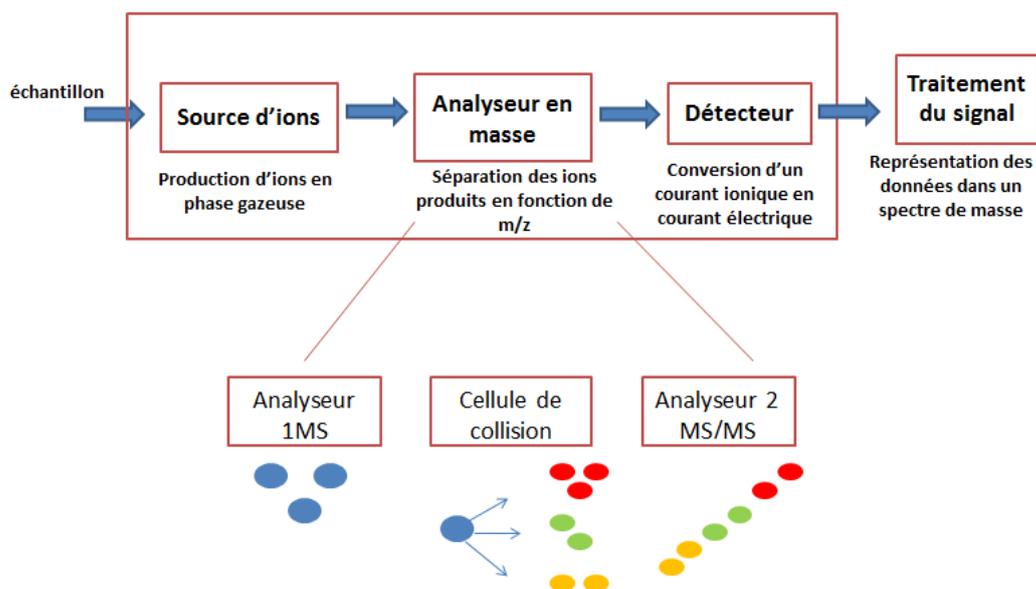
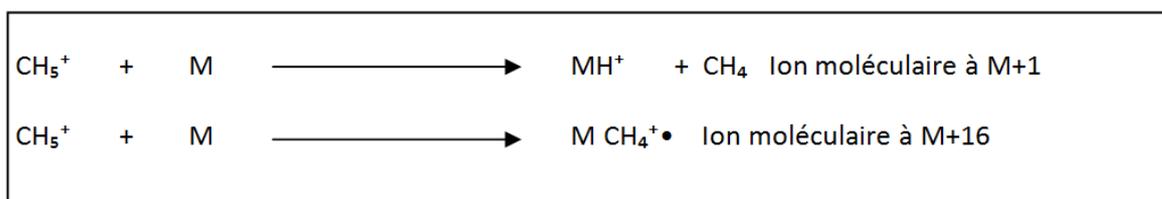
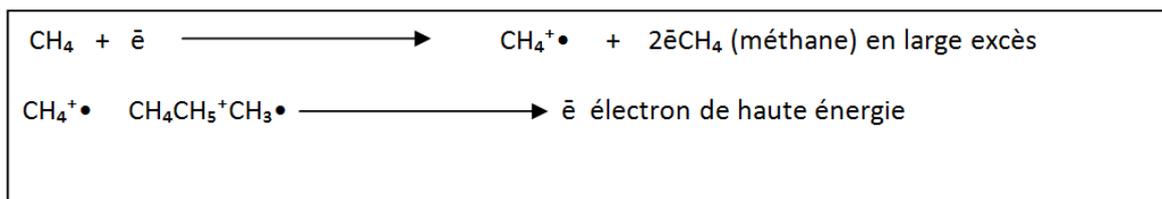


Figure 11: Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse

IV.3.2 .L'ionisation dans la source

a) L'ionisation chimique

La spectrométrie de masse a longtemps été réservée à l'analyse de petits composés thermostables à cause de l'absence de techniques d'ionisation permettant l'ionisation et le transfert de macrobiomolécules intactes en phase gazeuse sans fragmentation excessive. Ce type d'ionisation s'adresse à des composés volatils, apolaires et stables à la chaleur.



Une molécule de méthane qui reçoit l'impact d'un électron à haute énergie émis par un filament chauffé à haute température va subir l'arrachage d'un électron pour donner un ion radicalaire chargé positivement ($\text{CH}_4^{\bullet+}$).

Il s'ensuit une réaction qui donne naissance à des ions CH_5^+ pouvant réagir avec les molécules d'analyte (M) arrivant dans la source. Ce type de réaction ions-molécules produit principalement des ions $[\text{MH}]^+$ et $[\text{MCH}_4]^{\bullet+}$. D'autres gaz d'ionisation chimique peuvent être utilisés, tels que l'isobutane et l'ammoniac.

b) La source MALDI (Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice)

Cette méthode d'ionisation a été décrite à la fin des années 1980 par une équipe japonaise menée par K. Tanaka (Matsumura et al. 1988). Cette ionisation s'adresse aux molécules polaires, peu volatiles comme les peptides et les protéines. Les avancées accomplies grâce à la source MALDI ont été reconnues dans le domaine scientifique et ont été récompensées en 2002 par un prix Nobel de chimie.

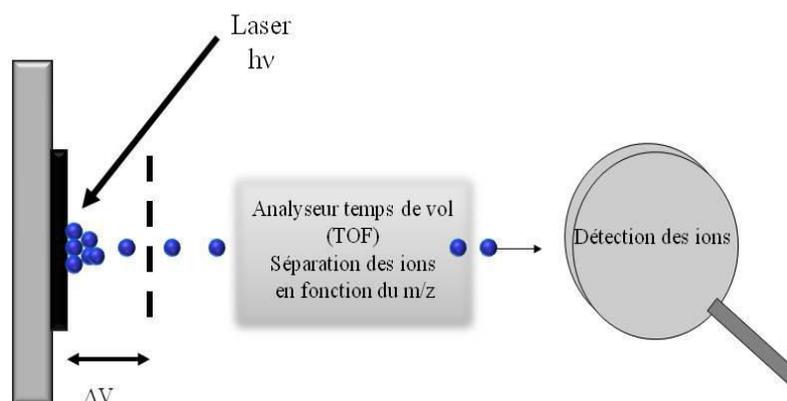


Figure 12: schéma d'une ionisation par la source MALDI.

L'analyte M est dispersé dans une solution saturée de petites molécules aromatiques (matrice) et l'ensemble est co-cristallisé par évaporation du solvant. Le dépôt solide obtenu est irradié par un laser de longueur d'onde où les molécules de matrice ont une forte absorption. Il en résulte la désorption des ions formés par transfert de proton (H^+) entre la matrice photoexcitée et l'analyte M: $[MH]^+$ (figure 12). Les matrices se différencient par la quantité d'énergie qu'elles induisent au cours de la désorption et de l'ionisation et par le degré de fragmentation qu'elles produisent. La matrice est aussi considérée comme source de protons H^+ permettant l'ionisation des analytes. Les matrices les plus couramment utilisées sont l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide α -cyano-4-hydrocinnamique (CHCA) pour l'analyse de peptides et de protéines entières. La source MALDI a une grande tolérance vis-à-vis des sels, des tensio-actifs et d'autres interférents. Selon le mode d'ionisation, il y a une génération préférentielle des ions monochargés M^+H^+ et MH . Les protéines ou les peptides sont les plus souvent analysés en mode positif. Toutefois, il est possible d'observer des ions d'adduits dus aux sels ou aux tampons (M^+K^+ , M^+Na^+ , $M^+NH_4^+$). La source MALDI est généralement associée à un analyseur à temps de vols (voir partie III).

c) La source « electrospray »

La naissance des sources « electrospray » ou (électronébulisation, ESI) date de la fin des années 1960 quand Dole met en évidence la formation d'ions directement à partir de la surface d'un liquide sous l'action d'un champ électrique intense (figure 13). L'électrospray est produit par application d'un fort champ électrique sur un liquide contenant l'analyte M traversant un capillaire. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du

liquide en sortie du capillaire, ce qui va former de fines gouttelettes hautement chargées (nébulisat).

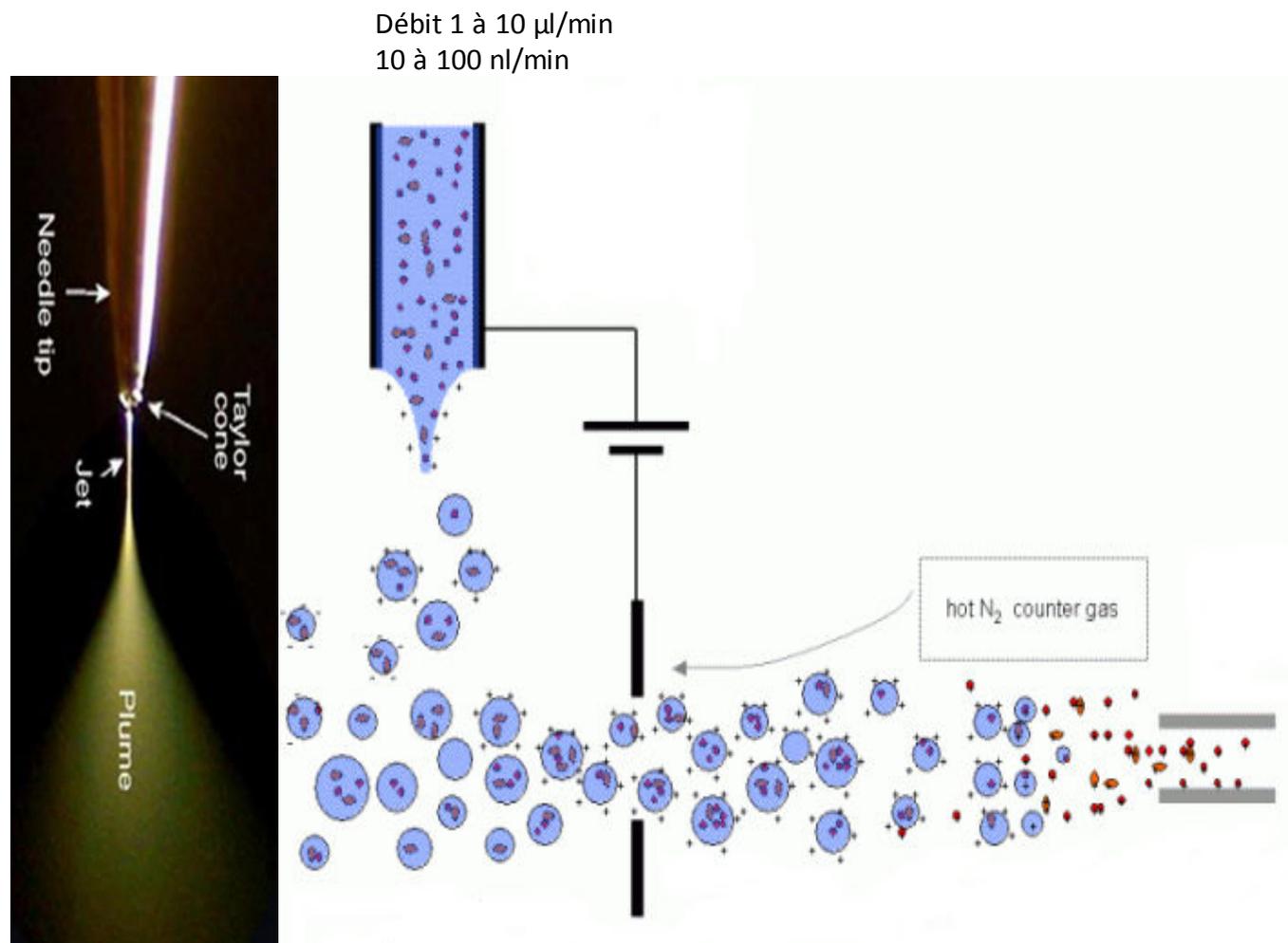


Figure 13: schéma de l'électronebulisation (ESI)

L'évaporation de solvant conduit au rétrécissement de la taille des gouttelettes jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit suffisant pour provoquer la désorption des ions. Contrairement à l'ionisation MALDI, les ions produits sont le plus souvent multichargés. L'obtention d'ions multichargés a comme avantage de permettre l'analyse de molécules pouvant atteindre des masses moléculaires supérieures à 100KDa, et par conséquent compatibles avec l'utilisation d'analyseurs à gamme de masse limitée, comme les pièges ioniques.

Quel que soit le mécanisme responsable de la formation des ions en phase gazeuse, l'ESI est aujourd'hui une méthode d'ionisation très répandue dans divers domaines (protéomique, biologie, chimie, pharmacie...).

IV.3.3. Les analyseurs

Différents types d'analyseurs de masse et d'instruments hybrides peuvent être couplés aux sources d'ionisation ESI et MALDI.

On distingue deux catégories :

- Les analyseurs à faisceaux d'ions : les quadripôles (Q) et les analyseurs à temps de vol (TOF: Time Of Flight)
- Les analyseurs à piégeage d'ions : Les analyseurs de type résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR : Fourier transform ion cyclotron resonance, l'orbitrap et les pièges à ions (IT : Ion Trap).

Ces analyseurs sont utilisés seuls ou assemblés (Q-TOF ou TOF-TOF) afin de former des hybrides possédant des avantages de chaque analyseur. Chaque analyseur possède des caractéristiques et performances analytiques propres à lui. Les principales caractéristiques d'un analyseur sont la résolution, la précision sur la mesure de masse, la sensibilité et la gamme de masse détectable, c'est-à-dire la gamme du rapport m/z qu'il peut identifier.

- La résolution représente la capacité de l'analyseur à séparer deux pics proches c'est-à-dire deux ions de m/z voisins (figure 14).

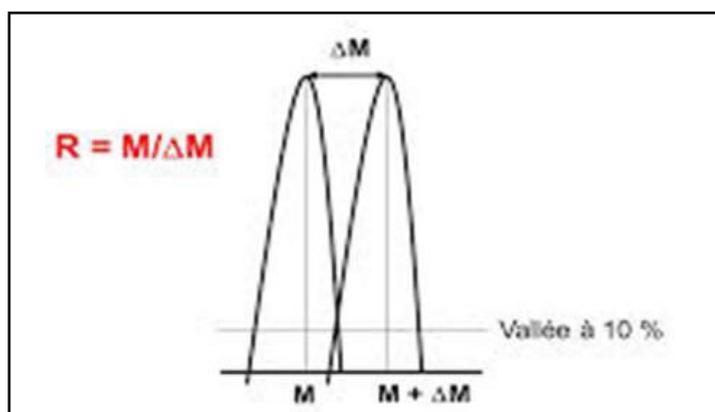


Figure 14: Représentation du calcul de la résolution d'un pic en spectrométrie de masse

R (Résolution) = $M/\Delta M$ correspond au rapport m/z mesuré (en Da)

ΔM correspond à la largeur du pic à mi-hauteur

Si $M/\Delta M < 5000$: résolution faible

Plus la résolution est élevée plus le pic sera fin et plus la mesure en masse sera précise.

- La précision sur la masse de m/z représente la capacité du spectromètre à mesurer la masse la plus proche possible de la masse théorique. Elle exprimée en ppm (partie par million). Elle est définie par le rapport : $(\Delta M/M) \times 10^6$, ΔM étant l'erreur commise sur la mesure de la masse théorique (M).
- La sensibilité correspond à la quantité minimale d'échantillon détectable

Les analyseurs sont également caractérisés par leur vitesse de balayage qui correspond au temps consacré pour l'établissement d'un spectre dans une gamme de m/z donnée.

Le tableau suivant compare les performances des analyseurs les plus courants :

Analyseur	Gamme de masse	Résolution	Précision sur la mesure de masse (ppm)
Quadripole	10^3 à 10^4	10^2 à 10^3	100
Piège à ions	10^3 à 10^5	10^2 à 10^3	50 à 100
Temps de vol	$>10^5$	10^3 à 10^4	5 à 20
Résonance cyclotronique	10^4	10^4 à 10^6	0,1 à 5
Orbitrap	10^5	10^6	1 à 2

Tableau 3 : Principales performances et caractéristiques des analyseurs

La source MALDI est généralement utilisée avec un analyseur à temps de vol (TOF). Il s'agit de mesurer le temps de vol d'un ion préalablement accéléré au travers d'une région libre de champ « ou tube de vol » avant d'atteindre le détecteur. Le rapport m/z est directement lié au temps de vol et à la vitesse des ions selon les relations suivantes :

$$m/z = 2V_0 t^2/l^2 \quad (V_0, l \text{ sont connus})$$

$$m/z = \text{fonction du temps de vol}$$

Pour la protéomique, différents types d'analyseurs peuvent être utilisés : des analyseurs de basse résolution comme le quadripôle (Q) et la trappe ionique (Ti), des analyseurs haute résolution comme le temps de vol (TOF), ou encore plus résolutifs comme la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap®

a. Les analyseurs à temps de vol (TOF)

Par son concept de base, l'analyseur TOF est le plus simple des analyseurs. Il consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré par une tension électrique, à parcourir une distance donnée dans un tube de vol (région libre de champ) pour atteindre le détecteur. La mesure du temps de vol des ions est corrélée à leur rapport m/z . L'analyseur TOF est adapté aux sources

pulsées (MALDI) puisqu'il nécessite que les ions soient produits par paquets successifs (figure 15).

Sous l'action du champ électrique, tous les ions de même charge ont la même énergie cinétique, ils vont se séparer dans la zone d'accélération selon leur vitesse acquise. Plus l'ion sera léger plus il sera rapide et arrive au détecteur plus rapidement qu'un ion lourd. Les analyseurs TOF ont une très haute sensibilité puisqu'ils détectent tous les ions. Mais la limitation de cette technique à ses débuts était sa faible résolution à cause de la dispersion énergétique à l'entrée de l'analyseur.

En mode de détection linéaire, la résolution est faible, de l'ordre de 5000. Ce mode de détection n'est pas limité en m/z . Il est adapté particulièrement à l'étude des molécules de haute masse moléculaire comme les protéines entières.

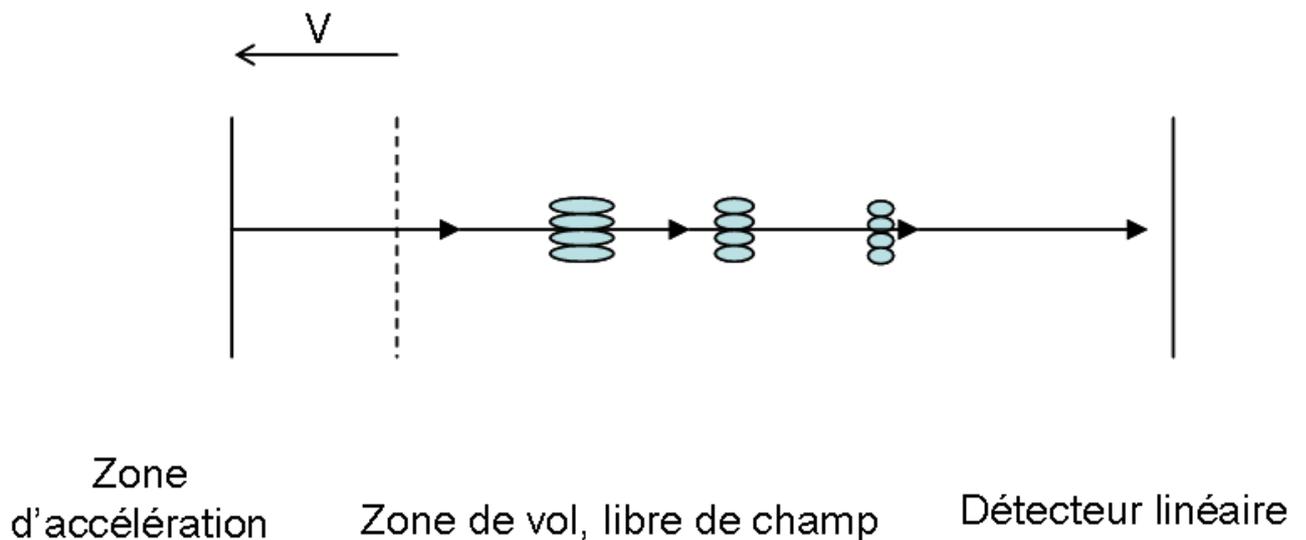


Figure 15: Trajet d'un ion en mode linéaire dans un analyseur TOF

Le mode linéaire n'est pas assez résolu pour identifier une protéine à partir de ses peptides tryptiques. Afin de corriger les dispersions énergétiques, deux développements ont permis d'améliorer les performances instrumentales : l'extraction retardée et l'utilisation d'un réflectron (Cotter 1992). L'extraction retardée consiste à homogénéiser les énergies cinétiques des ions dans la source avant leur injection dans l'analyseur.

Le mode réflectron correspond à l'interposition de miroirs électrostatiques sur le trajet des ions. Le miroir électrostatique impose un champ électrique de direction opposée à celle du champ accélérateur initial. La taille de l'analyseur étant la même, c'est la distance de vol qui va s'allonger. Les ions vont donc mettre plus de temps pour arriver au détecteur. La

dispersion a donc pu être réduite par une refocalisation des ions sur les plans temporel et énergétique, ce qui va améliorer leur résolution ($R=20\ 000$). Ce mode est plus adapté à l'analyse des peptides mais il est limité à des valeurs de m/z allant jusqu'à 10 000.

b) Les analyseurs quadripolaires

Un analyseur quadripolaire est constitué de quatre barreaux métalliques (ou électrodes) parallèles sur lesquels sont appliquées des tensions permettant de guider les ions (figure 16). Il fonctionne comme un filtre en ne laissant passer à un temps donné que des ions d'un rapport m/z donné.

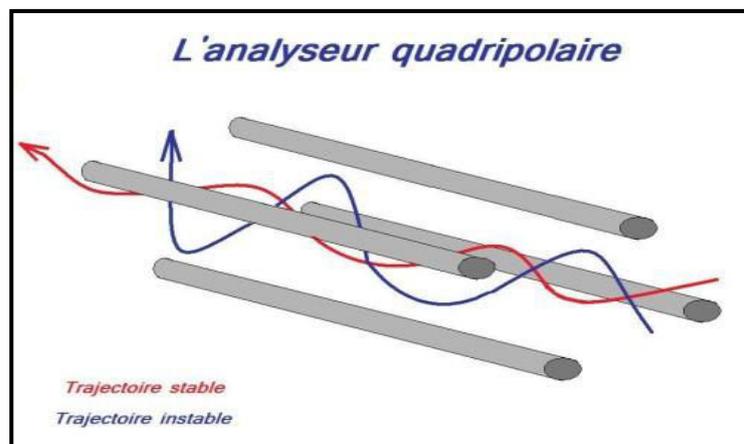


Figure 16: Principe d'un quadripôle à section cylindrique

Le trajet des ions dans le quadripôle est oscillant. Si l'amplitude des oscillations est trop grande, les ions sont collectés par les barres du quadripôle et ils ne seront pas détectés.

On règle la tension continue (U) et alternative (V) de sorte que seul un ion de rapport m/z choisi puisse se frayer un chemin jusqu'au détecteur (trajectoire stable). Pour obtenir des mesures sur une gamme de rapports masse/charge, on modifie les réglages de l'appareil à haute fréquence.

Dans le cas d'un analyseur à trappe ionique, les ions décrivent des mouvements oscillatoires stables au centre de la trappe. Par application d'une rampe de radiofréquences au niveau de l'électrode annulaire, les ions auront une trajectoire déstabilisée et seront éjectés de la trappe en fonction de leur m/z croissant. Un couplage ESI-Trappe à ions (IT) est souvent utilisé pour différentes études en protéomique.

c) La trappe ionique

La trappe ionique a également été développée par Paul et améliorée avant sa commercialisation par Stafford (Stafford, Pollock, et Wenzel 1984). La différence avec le quadripôle réside sur sa capacité de piégeage qui lui confère une excellente sensibilité.

Le piège ionique est constitué de 3 électrodes, 2 électrodes quasi hyperboliques ou « électrodes chapeaux » et une électrode annulaire (figure 17). Les ions décrivent des mouvements oscillatoires. Afin d'améliorer le piégeage des ions, un gaz (généralement de l'hélium) est utilisé dans la trappe pour stabiliser les ions en les freinant.

La capacité de piégeage peut-être adaptée suivant l'amplitude de fréquence appliquée. Ainsi, une grande amplitude va favoriser le piégeage des ions de hauts m/z . Pour une amplitude donnée, un cut-off est observé et correspond à la valeur de plus petit m/z capturé. Lors de cette étape, les ions instables ne sont pas piégés dans la trappe.

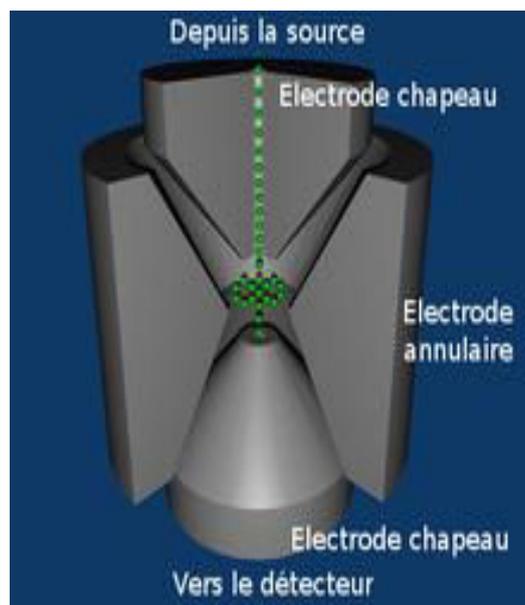


Figure 17: Trajectoire ionique dans un piège ionique

L'étape suivante est l'éjection des ions vers le détecteur. Un balayage de radiofréquence V va entraîner l'expulsion des ions piégés par ordre croissant de m/z vers le détecteur. La trappe ionique présente une gamme de masse accessible semblable au quadripôle.

d) L'analyseur à résonance cyclotronique par transformée de Fourier (FT-ICR)

Afin de réaliser des analyses MS/MS, il n'est pas obligatoire d'utiliser des spectromètres de masse hybride. Les spectromètres de masse à piège ionique offrent aussi des MS^n . Parmi ceux là, les analyseurs à transformée de Fourier tiennent une place particulière du fait de leurs très

grandes performances en terme de résolution et de précision de masse. Cet instrument FT-ICR a été inventé par Melvin et Comisarow en 1974 (Melvin B. Comisarow 1974). Le principe utilisé dans cet analyseur pour la détection des ions consiste à piéger les ions produits par la source dans une cellule à l'intérieur d'un aimant, la cellule ICR. Il s'agit de la mesure de la fréquence d'ions soumis à un champ magnétique intense et adoptant un mouvement circulaire fréquence cyclotronique (F). Cette fréquence est caractérisée par le rapport m/z de chaque ion.

La spectrométrie de masse de type FT-ICR repose sur le fait que des particules chargées, animées d'une vitesse v se déplaçant dans un champ magnétique oscillant de fréquence identique à la fréquence cyclotronique, sont accélérées et adoptent un mouvement circulaire de plus grande amplitude (figure 18). Ce mouvement est appelé mouvement « cyclotron » et en l'absence de champ électrique, sa fréquence ne dépend que du champ magnétique et du rapport m/z de l'ion. On conçoit ainsi qu'une mesure de la fréquence de rotation nous permet de déterminer le rapport m/z de l'espèce considérée :

$$F = 15357. B_z/m \quad F = \text{fréquence cyclotronique} ; B = \text{force du champ magnétique} ;$$

$z = \text{état de charge de l'ion} ; m = \text{masse de l'ion}$

L'analyseur FT-ICR permet d'atteindre une résolution (plus de 500 000), une précision (1ppm) et une sensibilité excellente, mais est aussi associé à un coût important d'acquisition et d'entretien.

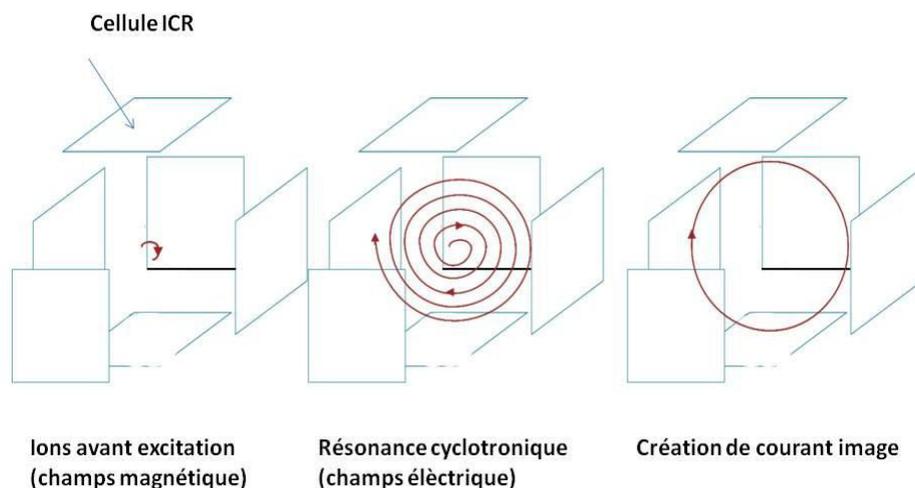


Figure 18: Schéma de la résonance cyclotronique des ions dans la cellule ICR

e) L'orbitrap

Ce type d'analyseur a été développé par Makarov en 2000, le principe de l'Orbitrap se base sur le piégeage orbital de Langmuir et Lingdon (Makarov 2000). Il est composé d'une électrode creuse, à l'intérieur de laquelle est placée coaxialement une électrode en forme de fuseau. Un champ électrostatique quadripolaire est généré par la géométrie spécifique de ces 2 électrodes. Cet appareillage consiste à capturer des ions en orbite autour d'une électrode centrale (figure 19). Les ions sont injectés tangentiellment à l'électrode centrale et piégés autour d'elle vont osciller axialement suivant une fréquence dépendant de leur rapport m/z .

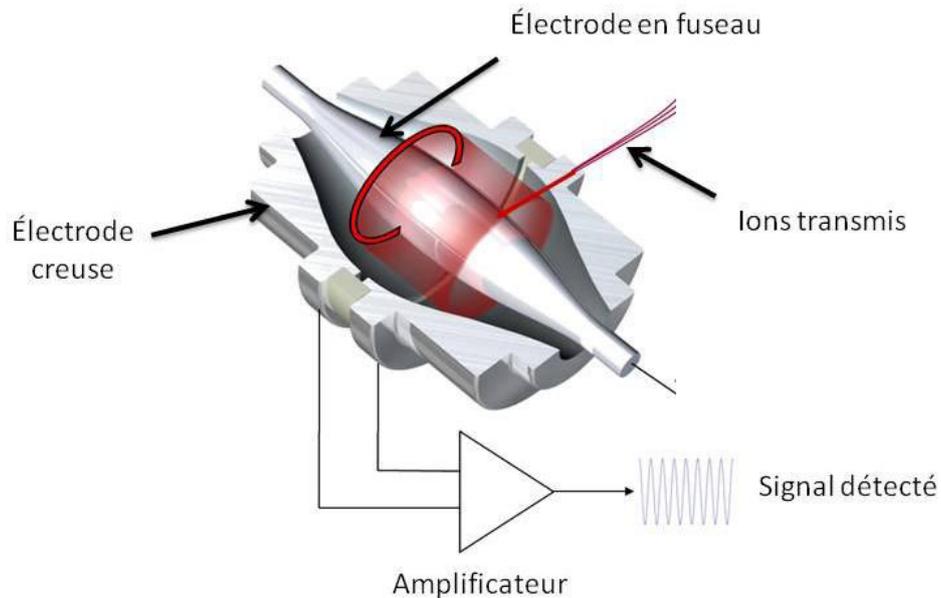


Figure 19: Représentation d'une cellule Orbitrap (d'après Thermo Fisher Scientific)

Ainsi, de la même façon que pour le FT-ICR, pour convertir le signal détecté en spectre de masse MS, le courant induit par ces oscillations est traité par une transformée de Fourier. Le spectre obtenu présente l'intensité relative de chaque peptide en fonction de son ratio masse/charge (m/z). L'Orbitrap présente une particularité qui consiste à une bonne précision (1-2 ppm) et une résolution proche du FT-ICR allant jusqu'à 240 000.

Une grande partie des analyses réalisées au cours de ces travaux a été effectuée sur un spectromètre doté d'un analyseur de type orbitrap, une source d'ionisation nanoESI avec une MS/MS effectuée par CID (collision ionisation désorption).

Il est à noter que chaque type d'analyseur présente des caractéristiques différentes et serait de ce fait adapté à l'analyse protéomique dans ses différents aspects : identification d'une protéine isolée, quantification des protéines dans un mélange biologique, détermination des modifications post-traductionnelles... Dans certains cas, il est nécessaire d'associer plusieurs

analyseurs, on parle ainsi de la spectrométrie de masse en tandem. Qu'ils soient couplés ou non, la plupart des analyseurs produisent des signaux dirigés vers différents détecteurs.

IV.3.4. Les détecteurs

Ils sont tous basés sur des principes physiques différents mais qui offrent tous la même fonction primordiale dans un spectromètre de masse celle de compter les ions. Pour notre étude utilisant l'orbitrap comme pour le FT-ICR, la détection est effectuée par mesure du courant induit par les ions en mouvement. Le détecteur le plus couramment utilisé est celui de type multiplicateur de photons. Il existe aussi des détecteurs à détection directe tels que les plaques photographiques et les cylindre de Faraday.

La détection par les plaques photographiques est considérée comme la moins sensible. Elle consiste à mesurer le noircissement d'une plaque recouverte d'une émulsion photographique par les ions venant la percuter. Le noircissement, du à l'émulsion du bromure d'argent, est proportionnel au nombre d'ions présents. Le cylindre de Faraday est un collecteur cylindrique dans lequel les ions frappent une surface conductrice à l'extrémité du cylindre. Il y aura ainsi un transfert de la charge de l'ion sur cette surface et une différence de potentiel est ainsi mesurée. Par défaut de sensibilité de ces deux techniques de détection, il y a eu recours de nos jours aux méthodes de multiplication d'électrons produits par les ions. Dans un multiplicateur d'électrons, les ions sont convertis en électrons qui seront multipliés sur une série de dynodes. La série de dynodes peut être remplacé par des tubes capillaires, les galettes de microcanaux. Les multiplicateurs peuvent également être associés à un multiplicateur de photons. L'amplification du signal par les dynodes forme de multiples électrons qui sont convertis en photons après avoir heurté un scintillateur. Les photons sont alors focalisés sur un photomultiplicateur.

Une fois amplifié, le signal est traité informatiquement pour produire un spectre de masse.

IV.3.5. Spectrométrie de masse en mode tandem

a) Principe

La découverte de la spectrométrie en mode tandem (MS1 et MS/MS) a été considérée comme une révolution dans le domaine analytique. Elle combine deux analyseurs et permet de réaliser le séquençage des peptides d'intérêt.

Les appareillages construits pour réaliser ces expériences ont été appelés tandem car ils sont conçus de la manière suivante : une première étape MS1 qui consiste à sélectionner l'ion

« parent » précurseur d'un m/z donné (un ion particulier stable issu de la source d'ionisation) dans le premier analyseur et une seconde étape de MS2 qui consiste à analyser les ions « fils » issus de sa décomposition dans un deuxième analyseur et leur donner des valeurs m/z bien définies (figure 20).

Dans l'intermédiaire se situe la cellule de collision contenant des molécules sous forme gazeuse et permettant l'activation de l'ion précurseur qui conduit à son excitation (augmentation de son énergie interne) et sa fragmentation (figure 21).

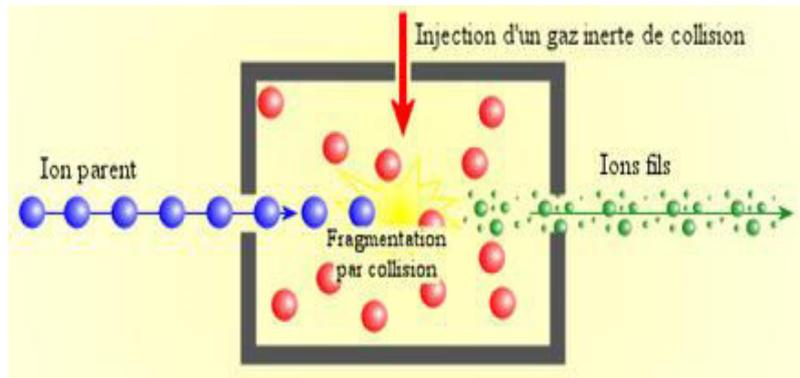


Figure 20: Les étapes de la fragmentation

A partir des données de fragmentation obtenues, il est possible de connaître la composition en acides aminés du peptide précurseur et de remonter ainsi à l'identité des protéines étudiées.

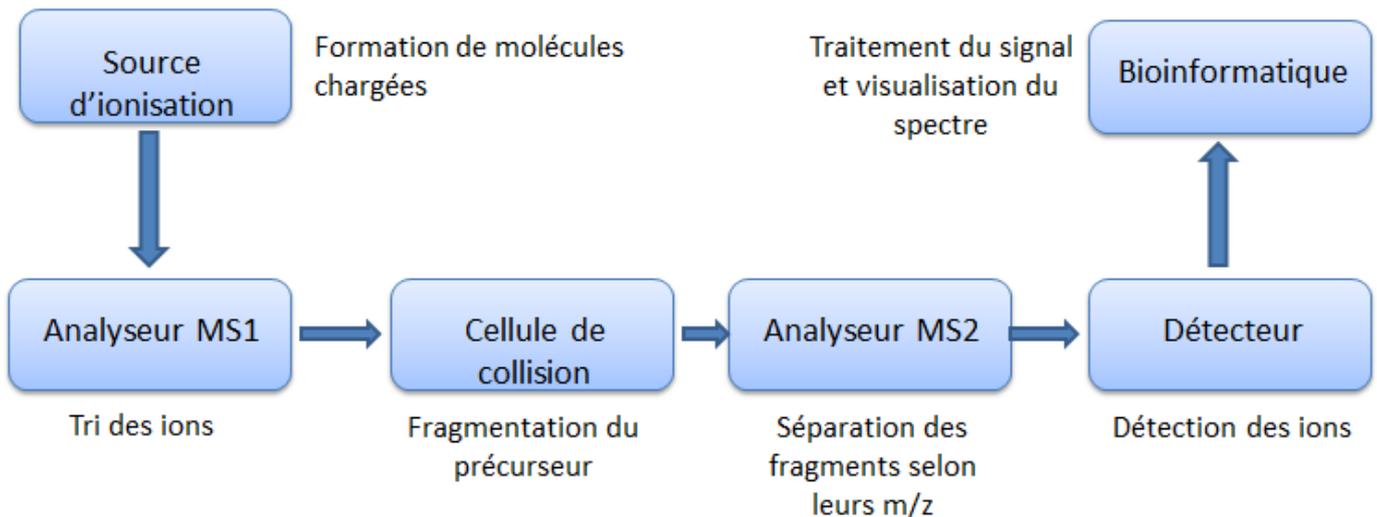


Figure 21: Principe de la spectrométrie de masse en mode tandem

Avec l'évolution technologique des dernières années, de nombreuses géométries d'instruments permettent d'accéder au mode de balayage MSMS. Elles ne seront pas toutes répertoriées.

Résumé des caractéristiques de la spectrométrie de masse :

- Très sensible : quelques attomoles peuvent être détectées
- Haute résolution permettant de distinguer les isotopes naturels d'un élément.
- Analyse rapide (quelques msec) et compatible avec des mélanges séparés par chromatographie en ligne.
- Génère de nombreuses données : les spectres MS, MS/MS qui renseignent sur la structure de biomolécules.
- Compatible avec l'étude de mélanges hautement complexes comme un protéome entier.

IV.4. Applications de la spectrométrie de masse aux peptides, aux protéines et au protéome

IV.4.1. Identification des protéines : Protéomique descriptive

La spectrométrie de masse est considérée comme un outil analytique de choix pour déterminer la structure primaire des protéines afin de les identifier de façon univoque. L'identification des protéines est de ce fait la dernière étape de l'analyse protéomique. Il existe deux grandes stratégies en analyse protéomique, la stratégie « Bottom-Up » qui est la plus largement utilisée, et la stratégie « Top Down ». Dans ces travaux de thèse seule la première méthode qui a été utilisée.

IV.4.1.1. La stratégie « Bottom-Up »

Auparavant l'identification protéique a été réalisée par micro-séquençage chimique (Edman 1949), elle repose maintenant majoritairement sur les techniques SM beaucoup plus sensibles et rapides. Les protéines sont séparées soit par méthode in-gel ou off-gel puis sont soumises à une digestion par une protéase (le plus généralement la trypsine). La digestion tryptique coupe la chaîne peptidique du côté C-terminal de la lysine ou de l'arginine. Le mélange peptidique ainsi obtenu est analysé par spectrométrie de masse. L'identification est finalisée en comparant les données expérimentales obtenues avec les données théoriques présentes dans des banques de données (ex. SwissProt, NCBI, IPI, ...) (Domon et Aebersold 2006).

L'une des méthodes d'identification se base sur l'annotation des spectres MS/MS obtenus après fragmentation des peptides analysés par le spectromètre de masse en tandem.

➤ La fragmentation peptidique :

Dans le but d'obtenir des informations de séquences peptidiques, la molécule à étudier doit subir une étape de fragmentation d'une ou plusieurs liaisons. Ainsi la masse des fragments obtenus sera reliée à la structure chimique des peptides et de l'analyte en question.

La méthode la plus utilisée permettant de transférer aux ions stables, produits par ionisation, de l'énergie nécessaire à la fragmentation est la dissociation induite par collision (CID : collision induced dissociation ou CAD : collision activated dissociation).

Il existe deux types de collision CID :

- De basse énergie (de l'ordre de quelques électrons-volts (eV)) : ayant lieu par exemple dans l'analyseur de type quadripolaire. Par définition, un peptide est un copolymère d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques $-\text{CO}-\text{NH}-$ (liaisons amides). Il possède deux extrémités N-terminal (N-H₂) et C-terminal ($-\text{COOH}$) (figure 22).

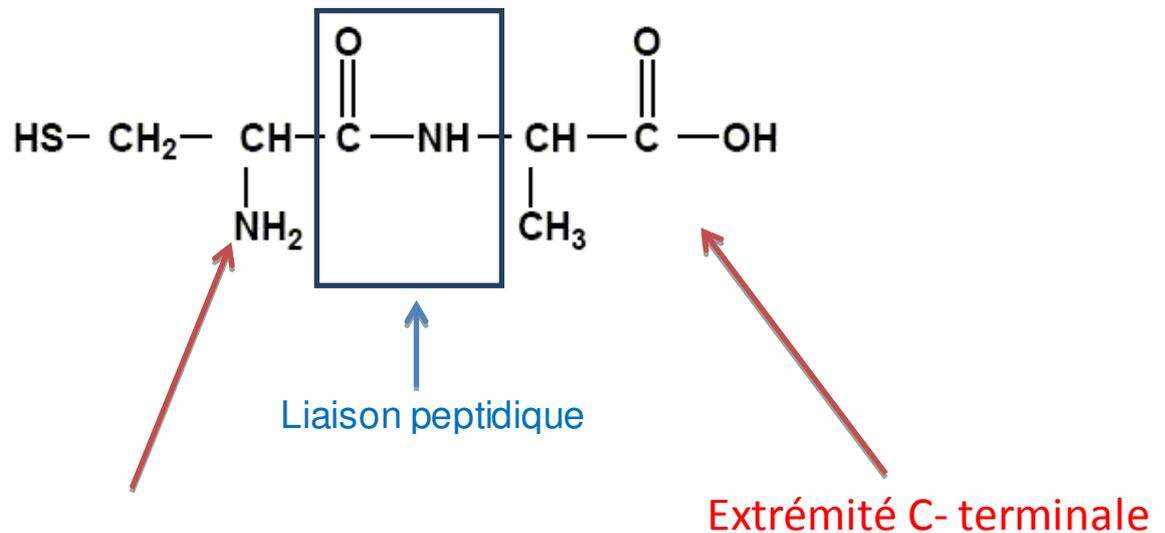


Figure 22: structure chimique d'un dipeptide

Au cours d'une analyse MS/MS les peptides se fragmentent majoritairement au niveau des liaisons peptidiques. Une version finale de la nomenclature des ions fragments a été proposée par Biemann en 1992 après qu'elle ait été mise en place en 1984 par Roepstorff et Fohlman (figure 23). La fragmentation de la liaison $-\text{CO}-\text{NH}-$ aboutit à la formation des ions b et y :

- ✓ b si la charge de l'ion est conservée par le fragment N-terminal du peptide

- ✓ y si la charge de l'ion est conservée par le fragment C-terminal du peptide

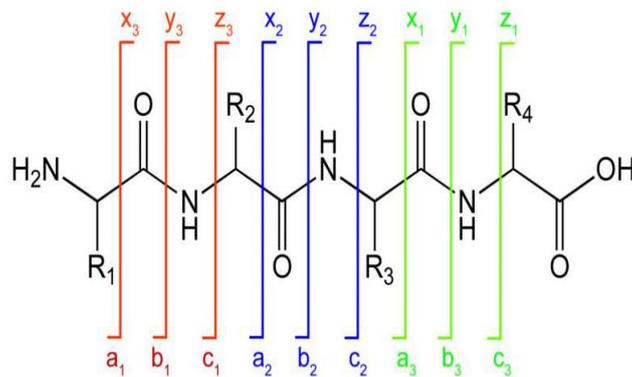


Figure 23: Nomenclature mise en place par Roepstorff et Fohlman

D'autres fragments peuvent avoir lieu par la fragmentation, ce sont les ions a et c (N-terminal), x et y (C-terminal) qui sont obtenus selon le lieu de fragmentation par rapport à la liaison peptidique.

Les peptides tryptiques sont les peptides les plus couramment analysés en protéomique : dans ce cas, la majorité des ions formés par ESI-MS sont dichargés, ils vont essentiellement générer des ions y et/ou b monochargés (Steen et Mann 2004).

La séquence du peptide est ensuite déduite par la différence de masse entre deux ions consécutifs d'une même série (sauf les ions isobares Leucine/isoleucine et les non isobares Glutamine/Lysine ayant le plus faible intervalle de masse existante entre deux acides aminés de l'ordre de 0.0363 Da).

- De haute énergie (quelques kilos eV) : très utilisée dans l'analyseur hybride de type TOF-TOF.

Pour ce type de fragmentation deux types d'ions peuvent être générés :

- ✓ Les ions portant une charge positive au niveau de l'acide aminé N-terminal. Ce sont les ions d. La coupure de la chaîne latérale se fait après le carbone β .
 - ✓ Les ions portant une charge positive au niveau de l'acide aminé C-terminal. Ce sont les ions v (coupure de la chaîne latérale se fait après le carbone ρ) et les ions w (coupure de la chaîne latérale se fait après le carbone β).
- Ions fils :

Chaque spectre MS est une image de l'éluion de peptides à un instant donné. Quand certains pics satisfont à des critères seuils fixés de façon préalable (mode « data-dependent analysis »), ils sont sélectionnés pour être fragmentés. Pour chaque précurseur fragmenté, un spectre de masse MSMS (ou spectre de fragmentation) est obtenu présentant les ions fils sous la forme d'une série de pics rangés selon leur m/z (figure 24). Une analyse fine des ions fils permet de déduire la séquence en acides aminés qui compose l'ion précurseur peptidique.

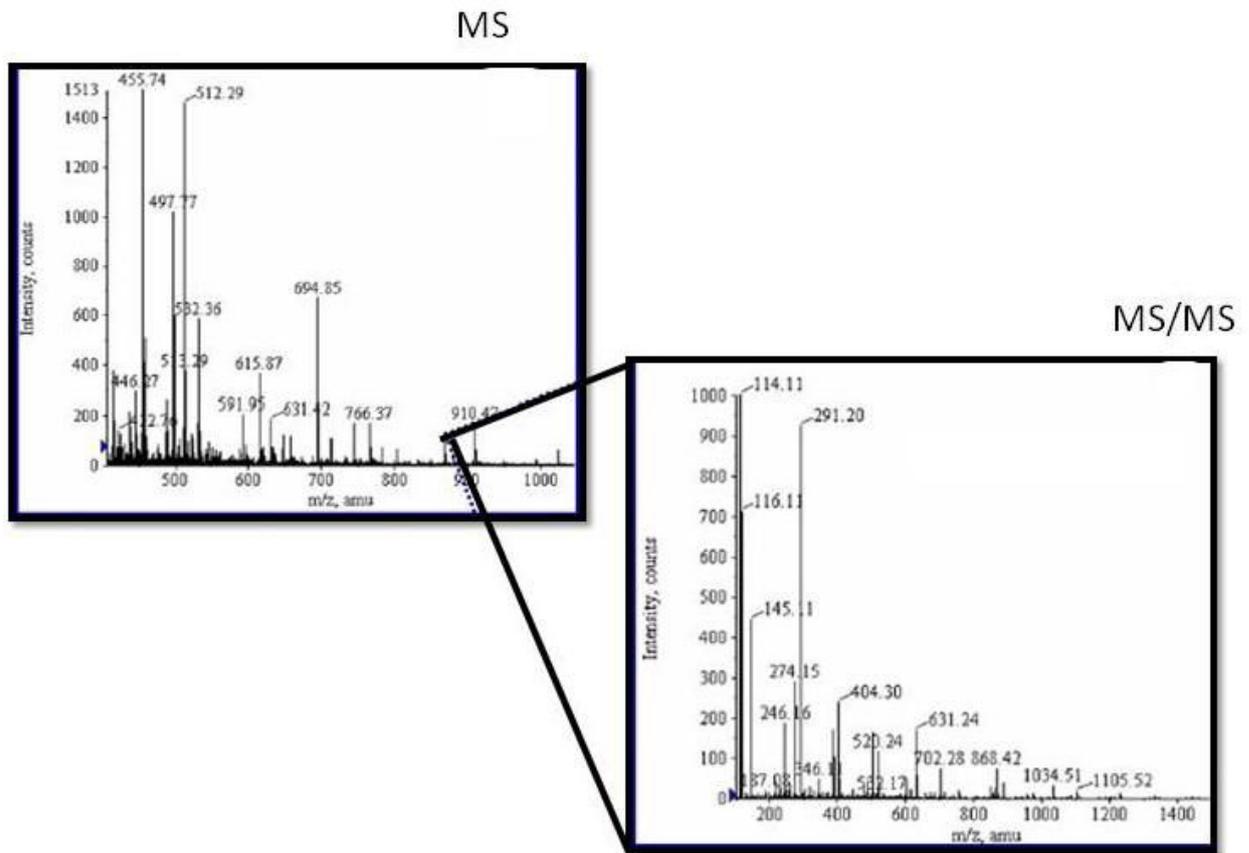


Figure 24: Spectre de masse MS et MS/MS

a) Identification à partir d'un spectre MS/MS

La MS/MS donne une information structurale, elle renseigne sur l'enchaînement séquentiel en acides aminés. Il s'agit d'une comparaison des spectres de masse obtenus expérimentalement avec des spectres MS/MS théoriques. Ces derniers sont obtenus après une digestion 'in silico' des protéines présentes dans les bases de données. Des outils comme Mascot (Perkins et al. 1999) ou Sequest (Ducret et al. 1998) permettent d'automatiser et de valider l'identification des protéines.

Il est aussi possible d'exploiter les spectres de la fragmentation MS/MS afin de déterminer directement la séquence en acides aminés de chaque peptide (figure 25). L'identification

parle de l'empreinte peptidique de la protéine (en anglais, *Peptide Mass Fingerprint*, PMF). On dispose à l'heure actuelle de banques de séquences (databases) regroupant les séquences de plusieurs millions de protéines de différentes espèces. Ces banques contiennent des cartes peptidiques théoriques avec lesquelles seront comparées les cartes peptidiques expérimentales comme évoqué précédemment. D'une façon générale, en l'absence de données MSMS ces données sont beaucoup moins spécifiques ; c'est pourquoi les stratégies MSMS se sont largement imposées au cours des dernières années.

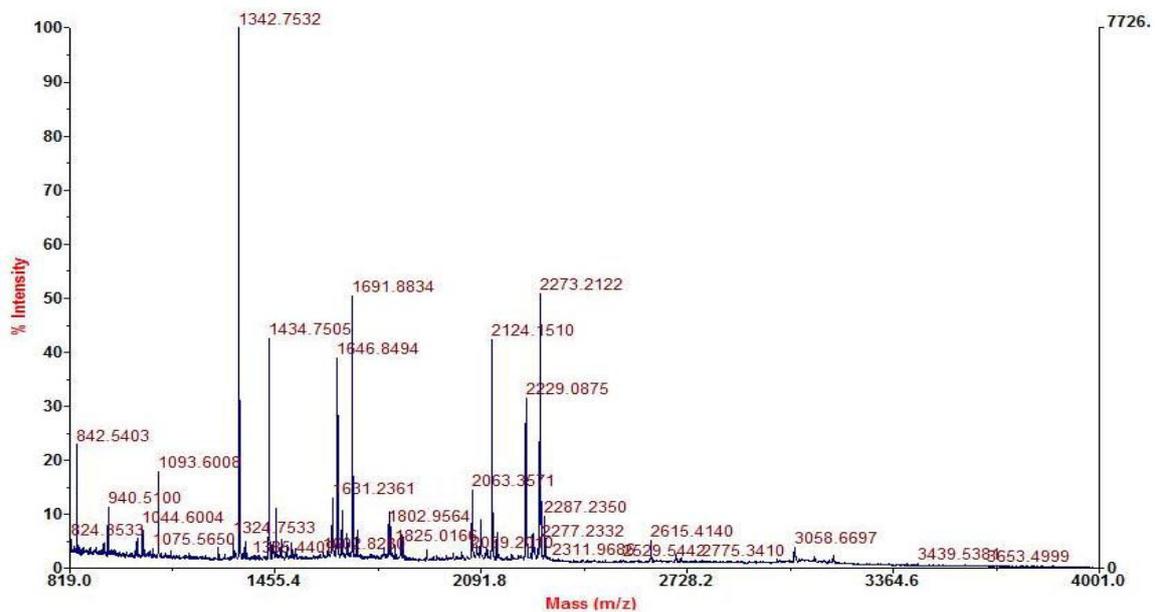


Figure 26: Spectre de masse correspondant à l'empreinte peptidique d'une protéine

IV.4.1.2. stratégie Top-Down

Développée par McLafferty, cette approche consiste à fragmenter une protéine native dans le spectromètre de masse (Kelleher et Duggan 1999) dans étape d'hydrolyse chimique ou enzymatique préalable. De ce fait, des méthodes de fragmentation de plus haute énergie comme l'ETD ou l'ECD sont privilégiées (Xie, Bowman, et Zhang 2006; Bunger et al. 2008). Pour cette approche, par la complexité des spectres obtenus, les analyseurs de très haute résolution sont les plus adaptés à cette approche.

N'ayant pas été utilisée au cours de ces travaux, cette stratégie ne sera pas décrite davantage. Cependant, elle fait l'objet de nombreux développements dans différents laboratoires. En effet, cette analyse de protéine native trouve son intérêt dans l'étude des modifications

protéiques puisqu'aucun traitement préalable aux analyses n'est effectué contrairement à la stratégie Bottom-Up.

IV.4.2. Quantifications des protéines : La protéomique quantitative

En plus de l'identification des protéines, la protéomique vise également à comparer le protéome de divers échantillons, allant jusqu'à quantifier les protéines dans un contexte précis (figure27). Etant en plein essor, cette approche a pour but d'identifier des biomarqueurs protéiques, comparer et quantifier des variations d'expression de protéines dans des situations biologiques variées (conditions de contrôle vs conditions de stress, pathologiques au niveau d'une cellule, un organe ou un organisme (Arthur et al. 2001).

Deux approches ont été développées en protéomique quantitative : la quantification relative et la quantification absolue. La quantification relative consiste à comparer l'expression d'une protéine entre plusieurs échantillons et à déterminer des ratios d'abondance de protéines entre ces différentes situations d'étude. Quant à la quantification absolue est une étude ciblée sur des protéines bien définies à quantifier. Elle vise à déterminer avec précision la quantité la concentration molaire ou massique d'une protéine dans un échantillon. Dans notre étude, méthodes de quantifications relatives sont utilisées pour identifier et quantifier des biomarqueurs protéiques dans un état de stress oxydatif qui ont été corrigés par un traitement biologique bien déterminé, et la quantification absolue pour valider et comparer ces biomarqueurs potentiels sur de plus larges populations d'échantillons.

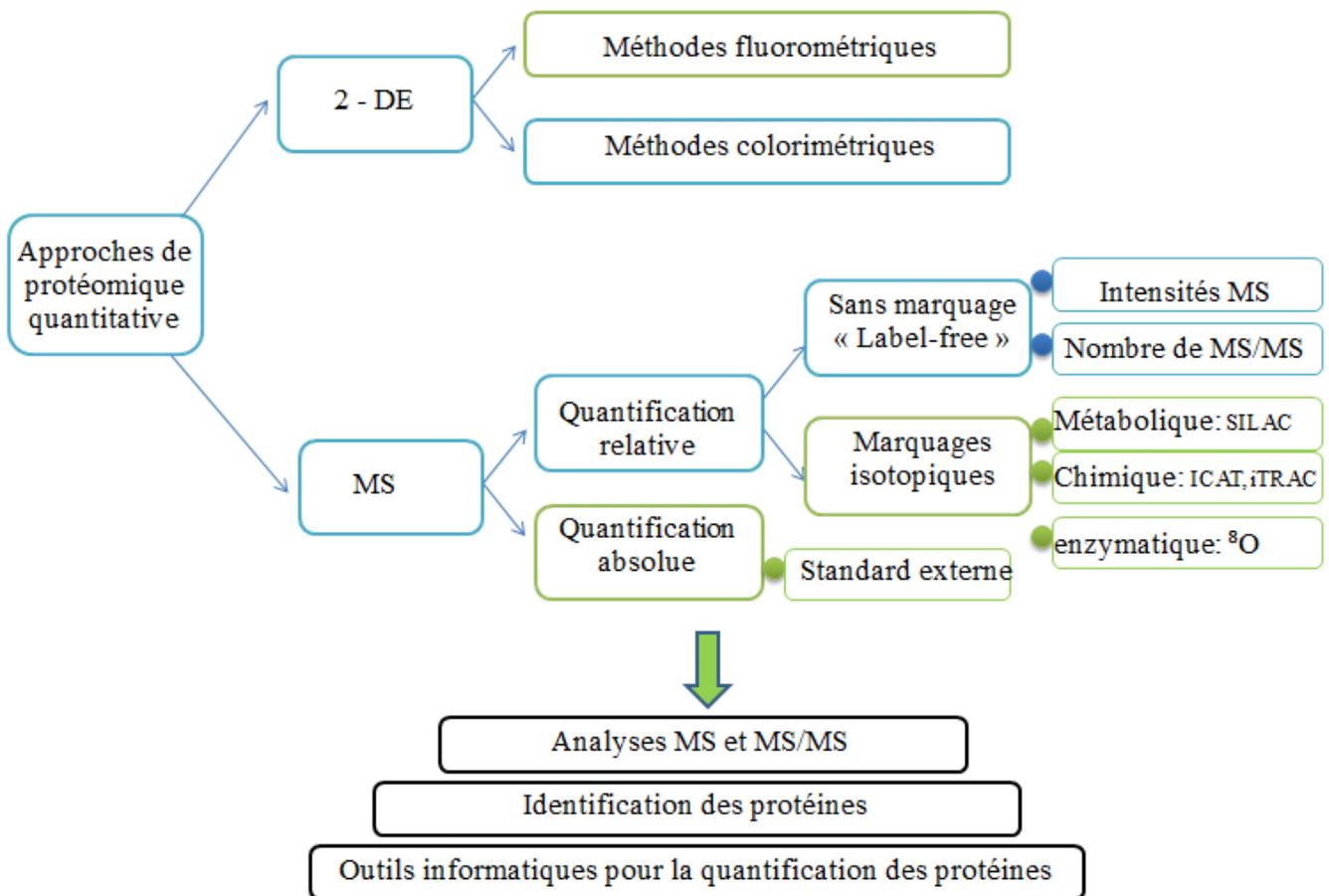


Figure 27: Stratégies utilisées pour l'analyse protéomique quantitative

IV.4.2.1. Quantification relative par électrophorèse bidimensionnelle

Lors de l'approche par 2-DE, les protéines sont révélées soit par des fluorophores ou par des colorants. Cette méthode a été la seule disponible pendant plusieurs années permettant d'étudier les différences d'expression protéique dans différents échantillons biologiques.

Les protéines séparées sont classiquement révélées par un colorant. Il existe plusieurs techniques de visualisation des protéines possédant différentes sensibilités et caractéristiques dans les gels d'acrylamide. Les colorants les plus utilisés en protéomique sont le bleu colloïdale et le nitrate d'argent qui sont considérés compatibles avec une analyse ultérieure par spectrométrie de masse. Après coloration, les cartes protéiques sont digitalisées pour une analyse comparative des images de ces gels. Des logiciels d'analyse comme DeCyder ou Samespots (Silva et al. 2010) permettent de détecter les protéines et de réaliser une analyse différentielle entre de multiples échantillons (figure 28). Il s'agit d'aligner les cartes

protéiques entre elles et de comparer les abondances de chaque spot protéique dans l'ensemble des échantillons. Ces logiciels, présentant des modules statistiques, permettent la mise en évidence de des protéines différentiellement exprimées dans un contexte physiologique donné. Les spots différentiellement exprimés sont alors soumis à des travaux d'identification.

Pour des échantillons peu complexes (généralement une protéine), une fois les peptides obtenus par une étape de protéolyse in-gel, ils sont ensuite analysés par spectrométrie de masse afin d'identifier la protéine présente dans ce spot (Aebersold et Mann 2003). Cette technique a une bonne résolution (5000 protéines séparées sur gel) mais son manque de reproductibilité entre les gels limite l'analyse en protéomique. Malgré le faible débit d'échantillons à analyser et le nombre restreint de protéines présentes sur gels (Ong et Mann 2005), la 2-DE permet de visualiser directement la présence de modifications post-traductionnelles de protéines.

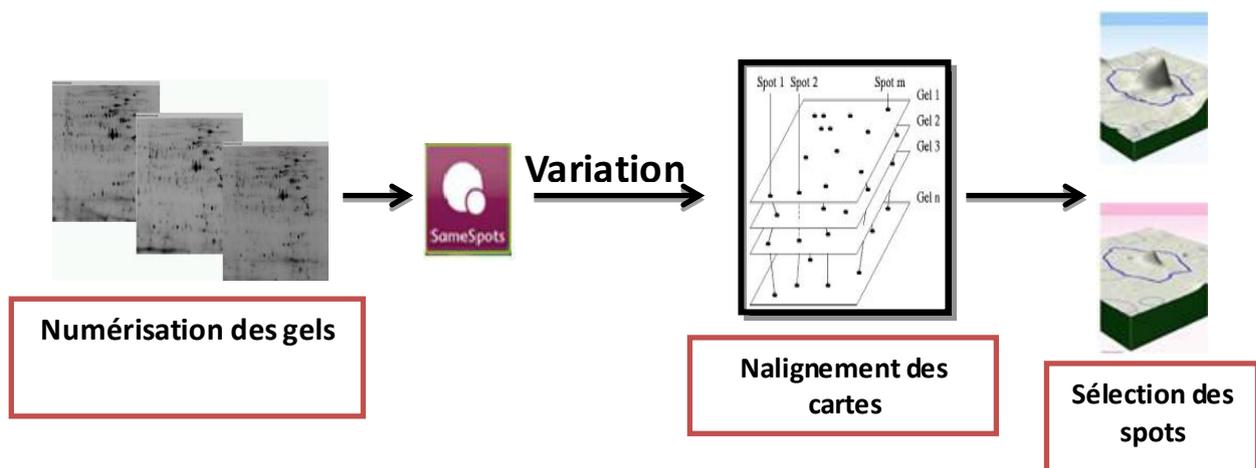


Figure 28 Analyse différentielle (comparative/quantitative) de cartes 2D

Cette approche a connu une avancée significative avec le développement de la 2D-DIGE (2 Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis) qui permet de séparer et comparer différents échantillons sur un même gel résolvant ainsi les problèmes de reproductibilité liés à la coloration et à la formation du gel de polyacrylamide. La DIGE se base sur le marquage covalent du groupe amine en epsilon des chaînes latérales des lysines par des cyanines fluorescentes : cyanine 2 (utilisé comme standard), 3 et 5 qui sont utilisées de tailles et de charges similaires mais de propriétés spectrales distinctes permettant de visualiser l'émission de leur fluorescence indépendamment l'une de l'autre. L'analyse différentielle réalisée avec des logiciels tels que SameSpots (Nonlinear Dynamics) consiste à aligner les gels entre eux (étape facilitée grâce à la co-migration de plusieurs échantillons) puis à comparer la

fluorescence des différentes cyanines pour chaque spot protéique (figure 29). L'abondance de chaque spot est mesurée relativement à celle du spot correspondant dans le standard interne présent sur le même gel (Alban et al. 2003).

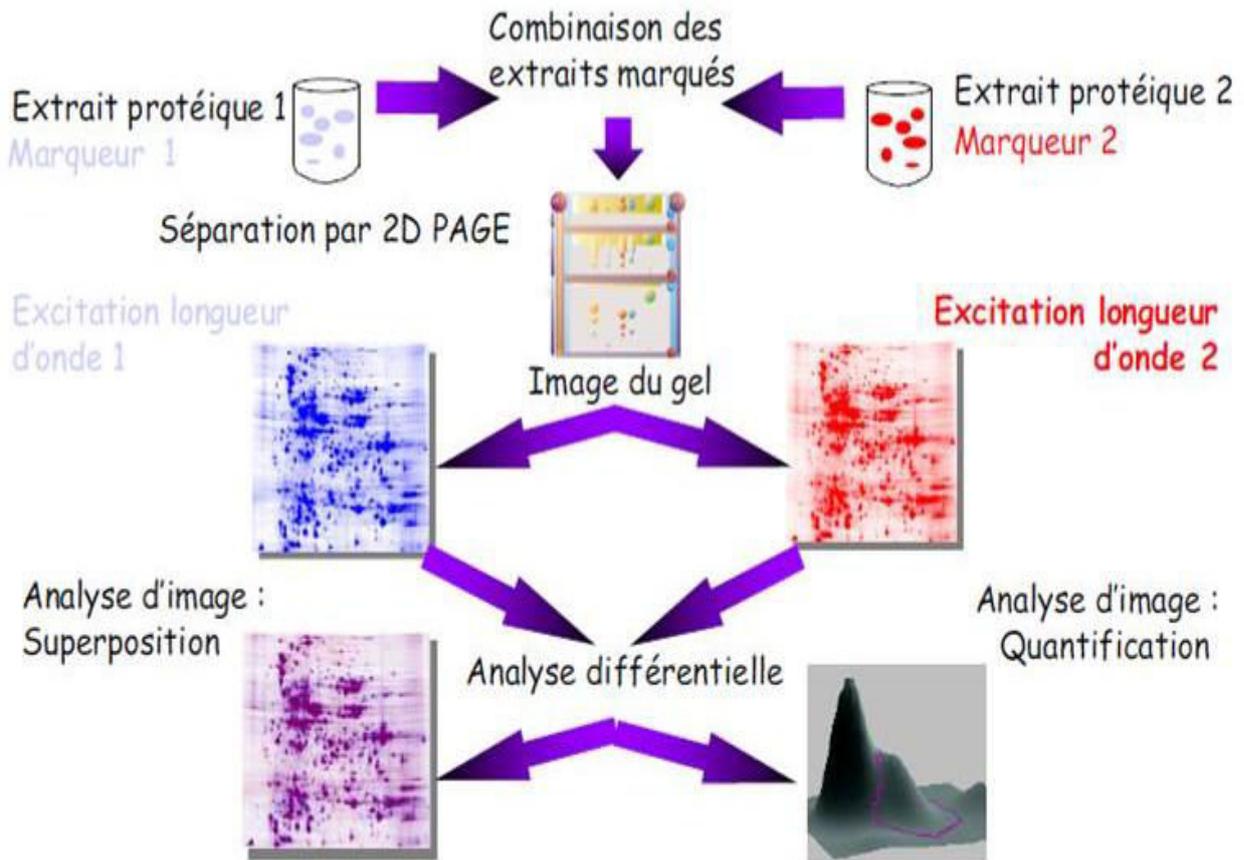


Figure 29: Principe de la DIGE (d'après GE Healthcare)

Malgré toutes ces innovations, ces méthodes souffrent d'une gamme dynamique limitée, rendant ainsi difficile l'analyse des protéines de faible abondance mais aussi d'un manque de résolution pour les protéines basiques ou acides (gamme d'étude de pI limitée) sans parler des protéines membranaires rarement observées.

IV.4.2.2. Quantification relative par spectrométrie de masse

L'analyse protéomique par spectrométrie de masse est l'approche la plus répandue actuellement afin d'identifier des protéines différentiellement exprimées. Deux stratégies d'analyse existent : La quantification relative avec un marquage préalable des échantillons ou sans marquage des échantillons (figure 27). Pour notre analyse seule la quantification relative sans marquage sera détaillée. Il est à signaler qu'il existe plusieurs formes de marquages qui peuvent être soit *in vitro* ou *in vivo* dans le cas de la quantification relative avec un marquage

préalable. On parle de marquage isotopique et marquage isobarique. En marquage isotopique, les peptides marqués de chaque condition gardent leurs propriétés physicochimiques, uniquement leur masse est modifiée. Ces marquages isotopiques sont réalisés au niveau de cellules par incorporation métabolique (SILAC : *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*), par des approches chimiques (ICAT : *Isotope Coded Affinity Tag*) et par marquage enzymatique (protéolyse avec marquage H_2O^{18}).

La spectrométrie de masse permet de déterminer la structure d'un peptide et d'identifier un peptide comme cela a été décrit précédemment. Une autre possibilité offerte par cette technique est la quantification de l'abondance d'un peptide dans un échantillon. La quantification de ce peptide permet de remonter à la quantité de la protéine dont il provient. Cette quantification relative consiste à mesurer le courant ionique généré par un ion de m/z donné et de comparer la valeur obtenue pour chaque échantillon. La quantification peut se baser sur l'ion parent (spectre SM) comme sur un ion fils (spectre MS/MS). Suivant le signal sélectionné, les limites diffèrent. En MS, les signaux sont plus intenses mais avec un bruit de fond qui peut être important et inversement en MS/MS, l'intensité du signal est plus faible mais le signal mesuré est plus spécifique.

➤ **Quantification relative sans marquage, « Label free » :**

Quant aux approches sans marquage (Label-free, spectral counting, AMT: Accurate Mass and Time), elles sont de plus en plus répandues. Moins onéreuses que les précédentes, elles ont été privilégiées pour l'analyse de nos échantillons biologiques en triplicate. Contrairement à l'approche de quantitative par marquage iTRAC qui nécessite une grande quantité en protéines (de l'ordre de 100 μg par échantillon) (Patel et al. 2009), la méthode label-free demande une quantité très modeste en protéines.

Dans ces situations, la quantification protéique peut s'effectuer soit par décompte des spectres de fragmentation annotés assignés à un peptide (Spectral Counting) soit par la mesure de l'intensité ionique des courants d'ions extraits correspondant aux peptides (*Accurate Mass and Time*, AMT). Lors de ces investigations, chaque échantillon est préparé et analysé individuellement par LC-MS/MS.

✓ **Le spectral counting :**

Cette technique se base sur la corrélation entre le nombre de spectres MS/MS et l'abondance du peptide dans l'échantillon (Washburn et al. 2002; H. Liu, Sadygov, et Yates 2004). Cette méthode est utilisée pour comparer l'abondance d'un même peptide dans plusieurs conditions.

En effet, une protéine abondante va générer un nombre important de peptides et par conséquent un grand nombre de spectres MS/MS (figure 30).

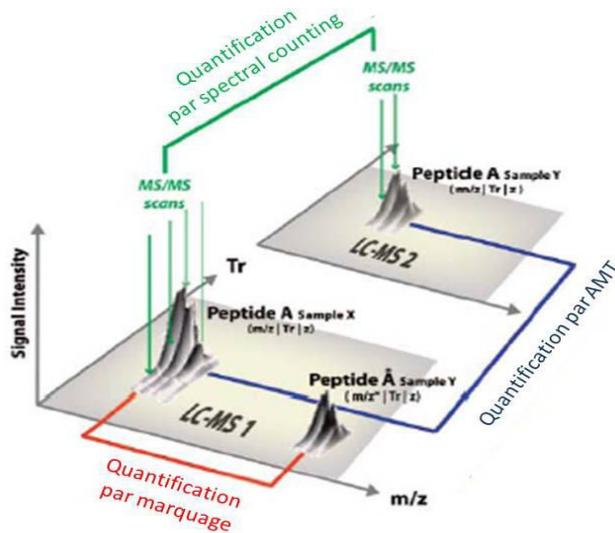


Figure 30: Représentation des approches sans marquage : Spectral Counting et AMT (Mueller et al. 2007)

Pour remonter à la quantification relative d'une protéine, il faut s'assurer de la bonne qualité d'identification des peptides, car une erreur d'identification influencerait ainsi l'abondance d'une protéine. De plus, les peptides conservés (présentant une séquence identique) chez plusieurs protéines posent problème. Pour éliminer ce biais, il est nécessaire de ne prendre en compte que des peptides appartenant uniquement à une protéine ; ils constituent des signatures protéotypiques (Mallick et al. 2007). Des approches statistiques permettent de pondérer l'abondance de la protéine en fonction du score d'identification (Allet et al. 2004). Une seconde limite de cette approche est la quantification des protéines de faible abondance, qui produisent peu de peptides identifiants (Colinge et al. 2005). Ainsi, dans le cas où seulement un à trois peptides seraient identifiés pour une protéine, la quantification réalisée ne serait pas considérée comme fiable.

✓ *AMT : Accurate Mass and Time*

Cette méthode ne se base pas sur le nombre de spectres obtenus mais sur l'intensité des signaux des spectres MS et particulièrement sur l'intensité du courant ionique total (XIC) d'un peptide (Chelius et Bondarenko 2002) (figure 31). Comme il a été mentionné au préalable, lors de l'étape MS, un peptide ionisé se caractérise par trois paramètres, son rapport masse sur charge m/z , son intensité et son temps de rétention. Avec ces données, il est possible de comparer l'intensité d'un ion présentant un temps de rétention et un rapport m/z donnés. Il a été montré qu'il existe une corrélation entre l'intensité du signal et la concentration ionique ; l'aire du pic chromatographique d'un peptide identifié augmentant

avec la concentration du peptide injecté (Voyksner et Lee 1999; Chelius et Bondarenko 2002).

Cependant, l'analyse comparative de différents échantillons nécessite une grande précision dans les valeurs de m/z ainsi qu'une très bonne reproductibilité des temps de rétention d'une séparation chromatographique à l'autre, associées à une étape de normalisation des intensités des courants ioniques obtenus. Les avancées techniques réalisées que ce soit en matière d'analyseur, de chromatographie et de logiciel de traitement des résultats (intégrant des modules statistiques adaptés) vont rendre possible la quantification relative des protéines d'une population. De plus, l'AMT requiert des outils spécifiques pour aligner les chromatogrammes (Zybailov et al. 2005).

Contrairement aux approches utilisant un marquage, les approches label free permettent de travailler avec une quantité faible d'échantillons et le nombre d'échantillons n'est pas restreint (Patel et al. 2009). Il est même démontré que ces méthodes sans marquage permettent d'identifier et d'étudier un plus grand nombre de protéines (Peppas et al. 2013). Cependant, certains auteurs suggèrent que la quantification est plus précise, plus reproductible avec les méthodes de marquage métaboliques et isobariques (Li, Adams et al. 2012). Ainsi, pour effectuer une quantification relative, les méthodes avec marquage semblent plus efficaces et reproductibles, mais présentent un certain coût et semblent réservées aux petits effectifs d'échantillons.

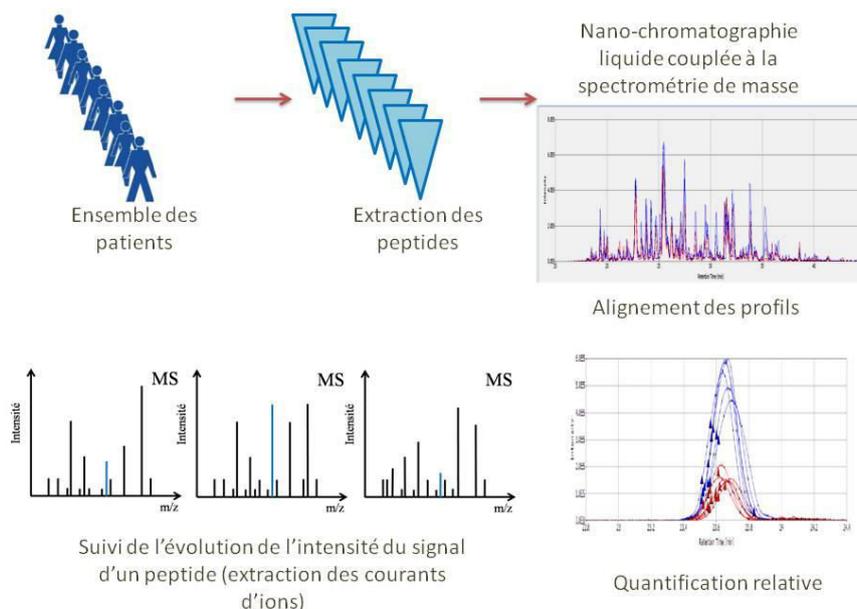


Figure 31: Principe de l'approche AMT (Cosette, Vittecoq et al. 2013)

Tableau 4 : Récapitulatif des approches de quantification en protéomique

Phase	Stratégie	Avantages	Inconvénients	
Découverte (Approche sans à priori)	2-DE, 2D DIGE	Haute résolution et sensibilité Détection directe de PTM Informations sur Mw et pI de la protéine	Faible débit Gamme dynamique limitée Protéines de faible abondance masqués Limite des Pi et Mw extrême	
	Marquage	SILAC	Débit moyen Automatisation plus aisée Haute résolution avec des séparations 2D ou 3D Précision de quantification plus élevée que label-free	Coûts élevés des kits Nombre limité d'échantillons à comparer Quantité de protéines nécessaire
		ICAT	Pas de marquage chimique Marquage en amont, moins de biais technique	Limité aux cellules en culture se divisant
		ICPL	Purification des peptides marqués	Marquage des cystéines
		iTRAQ	Sous-fractionnement	Marquage des lysines
		18O	Marquage de tous les peptides	Marquage tardif Fractionnement nécessaire (off-gel)
	Label-free LC-MS/MS	Marquage aisé de tous les peptides	Risque de marquage partiel Marquage tardif	
SELDI-TOF-MS	Débit moyen Automatisation plus aisée Haute résolution avec des séparations 2D ou 3D Limitation des coûts et des étapes de marquage Nombre illimité d'échantillons comparable	Moins précis que méthodes MS à base de marquage Coût du matériel Logiciel spécifique		
Validation (Approche basé sur un candidat)	Puces à protéine	Haut débit et automatisation aisée	Aucune identification des protéines	
	MRM-MS	Quantification absolue Haut débit et de l'automatisation Format de puce Haute puissance de multiplexage Haute sensibilité et précision haut débit	Besoin d'une instrumentation spécifique Développement des puces Sensibilité limitée au signal de fluorescence	
		Haute puissance de multiplexage Quantification absolue	Conception des transitions MRM complexe triple quadripôle	

Quantification absolue

Un biomarqueur à visée clinique doit forcément permettre de discriminer aisément des échantillons. Dans tous les cas, le marqueur le plus simple est à utiliser au sein de différents laboratoires reste la quantité en mole ou en masse par volume d'une protéine dans un échantillon.

a) Western blot

Cette technique a été décrite pour la première fois par Towbin *et al.* (Towbin, Staehelin, et Gordon 1979), et depuis, elle est utilisée communément pour identifier, quantifier et déterminer la taille des protéines. Towbin *et al.* ont combiné la séparation de protéines par électrophorèse sur gel et la technique immunologique. Après avoir été séparées sur un gel polyacrylamide, les protéines sont transférées vers une membrane de nitrocellulose (ou de nylon). Ensuite, la protéine d'intérêt est liée à un anticorps spécifique. Le complexe protéine-anticorps est alors détecté en utilisant un anticorps secondaire, couplé à une sonde à fluorescence (détection par fluorescence) ou à un enzyme qui va catalyser une réaction en présence d'un substrat particulier qui sera coloré ou émettra de la lumière (détection par chimioluminescence) (figure 32).

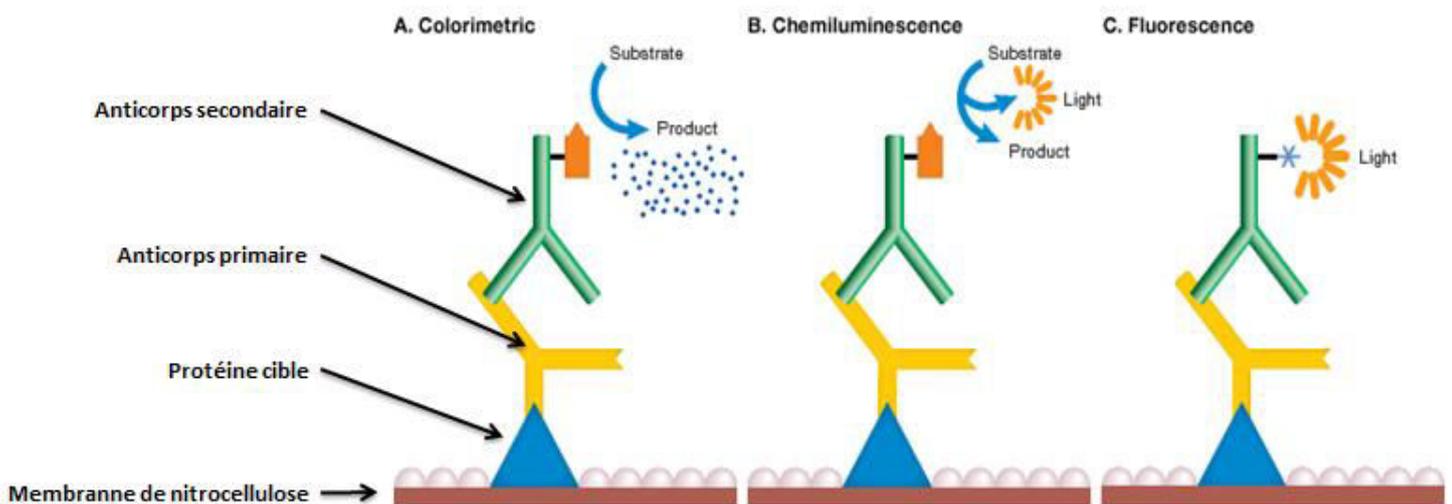


Figure 32: Protocole de Western blot

Le résultat de quantification obtenu par WB est lié fortement à la qualité des standards (protéines purifiées, dégradation), des anticorps (spécificité) et de la méthode de détection (linéarité, saturation). De plus le WB est assez laborieux, dépend de la qualité du gel préparé et une seule protéine peut être quantifiée par test.

b) ELISA(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Cette méthode se base sur la spécificité de reconnaissance entre un anticorps et sa protéine cible, l'antigène (Mendoza et al. 1999). Il s'agit de la détection d'une réaction antigène-anticorps dans laquelle l'anticorps est lié à un enzyme et va, en présence d'un substrat donné, former une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéine d'intérêt (anticorps ou antigène) dans l'échantillon. La quantification d'un composé par cette technique est possible en faisant une gamme en parallèle en utilisant des concentrations connues du composé cible (anticorps ou antigène).

La méthode « sandwich » permet le dosage d'un antigène qui se trouve entre 2 anticorps spécifiques, reconnaissant des épitopes différents de cet antigène, ce qui augmente la spécificité et la sensibilité de détection de cet antigène.

c) Dosage par spectrométrie de masse

L'utilisation du mode multiple réaction monitoring (MRM) sur un spectromètre de masse triple quadripôle (QQQ) permet de quantifier de façon fiable une ou plusieurs protéines au cours d'une seule analyse. La protéine est caractérisée par plusieurs peptides protéotypiques choisis comme précurseurs présentant des fragments caractéristiques, dénommées transitions. Généralement, plusieurs peptides sont requis, un peptide au moins pour la quantification et un autre pour la validation. De nombreuses études ont démontré le potentiel de cette technique (Jenkins et al. 2006).

Afin de déterminer de la façon la plus fiable possible la quantité d'une protéine dans un échantillon, la quantification absolue nécessite l'utilisation d'un étalon interne. Quand la protéine d'intérêt est connue (quantification ciblée), cette méthode est la méthode de choix puisqu'elle détermine la quantité absolue de la protéine dans l'échantillon. La méthode AQUA (Absolute quantification) utilise un peptide de référence marqué par un isotope stable ¹³C et ¹⁵N (ou des peptides isolés), conduisant à une différence de masse avec le peptide endogène. Ce peptide marqué a la même séquence en acides aminés que le peptide endogène et élué au même temps de rétention.

En 2005, Beynon *et al.* ont généré une protéine de synthèse (QconCAT) (quantification concatamer) qui est un ensemble des peptides tryptiques pour plusieurs protéines (Beynon et Pratt 2005; Pratt et al. 2006). Il s'agit d'utiliser une série de peptides présents sur une même molécule. Un plasmide contenant un gène artificiel codant pour les peptides protéotypiques des protéines d'intérêts est surexprimé dans E.Coli en milieu enrichi en ¹⁵N ou en présence

d'acides aminés marqués [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$] L-lysine and [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$] L-arginine (Brun et al. 2007). La protéine QconCAT est ensuite purifiée, sa concentration déterminée et enfin ajoutée avant l'étape de digestion trypsique pour produire les peptides marqués comme la méthode AQUA.

Brun *et al.* ont développé en 2007 la stratégie appelée PSAQ (Protein Standard Absolute Quantification) basée sur l'utilisation d'une protéine recombinante marquée identique à la protéine d'intérêt comme étalon interne (Brun *et al.*, 2007), l'ensemble de la protéine est exprimée dans un organisme hôte qui est cultivé sous les mêmes conditions que pour la production de QconCAT. Cet étalon interne ajouté en quantité connue dès la première étape de préparation représente un étalon idéal qui permet d'éviter tous les problèmes rencontrés en cas de l'utilisation des méthodes AQUA et QconCAT pendant les différentes étapes de préparation (purification, digestion) (Figure 33). De plus, tous les peptides protéotypiques d'une protéine sont marqués ce qui améliore la couverture de la séquence et la fidélité de la quantification.

Par contre, cette approche n'est pas adaptée à l'analyse des MPTs (modifications post-traductionnelles). Pour chaque protéine à quantifier, une protéine standard est nécessaire : coût élevé et difficulté de produire la protéine (laborieuse).

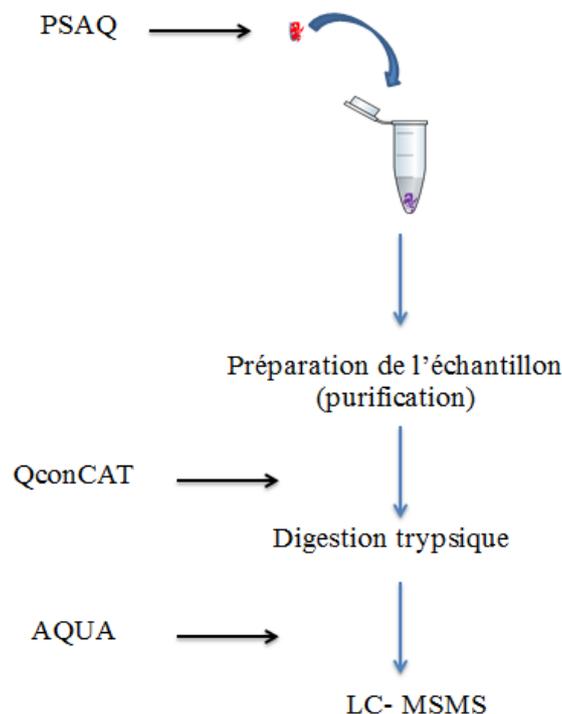


Figure 33: Les stratégies de la quantification absolue des protéines en utilisant la dilution d'isotope:

- PSAQ (protéine marquée) est ajouté tôt à la première étape de préparation de l'échantillon
- QconCAT (protéine de synthèse contient des peptides marqués pour différentes protéines cibles) est ajouté juste avant la digestion
- AQUA (peptide marqué) est ajouté après la digestion

Ainsi, plusieurs approches de quantification absolue par spectrométrie de masse continuent à être développées afin de mettre à disposition de nouveaux outils de validation de biomarqueurs identifiés par des approches sans a priori durant les phases de découverte

2^{ème} partie

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique et protocole expérimental

1.1. Animaux et régime alimentaire

1.1.1 Animaux

20 rats males (180-220 g) utilisés dans nos études proviennent d'un élevage de rats Wistar de l'institut Pasteur. Ils ont été subdivisés en 4 groupes expérimentaux composés de 5 rats chacun. Les animaux ont été pesés tous les 7 jours pendant les 8 semaines de traitement. L'expérimentation sur les rats a été menée en accord avec les recommandations européennes d'utilisation des animaux de laboratoire et avec les recommandations du *National Institutes of Health* (NIH). Les animaux ont été soumis à 12h de lumière par 24h (7h à 19h), à 22±2°C avec eau à volonté.

1.1.2 Régime alimentaire

Un lot a reçu un régime commercial (SD : *standard diet*). Les aliments se présentent sous forme de bouchons fournis par la société ALMAS (Bizerte) dont la composition se trouve dans le tableau 5.

	SD		HFD	
	Taux	Contribution énergétique	Taux	Contribution énergétique
Lipides	3,00%	5,22%	28,00%	39,10%
Glucides	40,00%	69,56%	32,00%	44,69%
Protides	14,5%	25,22%	11,60%	16,20%
Fer	50 mg/kg		40 mg/kg	
Calcium	1,45 mg/kg		1,16 mg/kg	
Densité énergétique	11,40 kJ/g		18,05 kJ/g	

Tableau 5: Composition de la nourriture des rats (ALMAS, Mateur, Bizerte)

Un autre lot a reçu une nourriture riche en graisse (HFD : *High Fat Diet* constituée de la nourriture habituelle qui a été préalablement saturée avec de la graisse d'agneau fondue. Cette graisse a été fondue par chauffage à 100°C, puis les bouchons sont mis à tremper pendant 15 min dans la graisse fondue. La nourriture HFD (tableau 5) a été administrée après séchage à température ambiante.

La composition qualitative en acides gras a été déterminée en réalisant un broyage en présence d'un solvant d'extraction chloroforme/méthanol (2 :1, v/v) (Folch, Lees, et Sloane Stanley 1957). Après centrifugation à 3000 g/min, on récupère à l'aide d'une pipette Pasteur la phase chloroformique inférieure contenant les lipides.

Acides gras	%	%
Acide myristique C14:0	0,17	Acides gras saturés (AGS): 71,70
Acide palmitique C16:0	24,69	
Acide stéarique C18:0	46,74	
Acide arachidique C20:0	0,09	
Acide docosanoïque C22:0	0,01	
Acide myristoléique C14:1w-5	0	Acides gras monoinsaturés (AGMI): 26,62
Acide Palmitoléique C16:1w-7	0,2	
Acide oléique C18:1w-7	26,3	
Acide Gadoléique C20:1w-9	0,12	
Acide linoléique C18:2w-6	1,12	
Acide linoléique C18:3w-3	0,08	Acides gras polyinsaturés (AGPI): 1,69
Acide eicosatriénoïque C20:2w-6	0,01	
Acide eicosapentaénoïque C20:5w-3	0,04	
Acide docosatetraénoïque C22:4w-6	0,18	
Acide docosapenténoïque C22:5w-3	0,24	
Acide docosaénoïque C22:6w-3	0,02	

Tableau 6: Composition de la graisse d'agneau (Charradi et al. 2012)

Les tubes contenant cette phase chloroformique ont été séchés dans un bain marie à 50°C. On ajoute le tampon TBS afin d'obtenir la solution (E1) qui sera utilisé pour déterminer les acides gras (tableau6).

1.1.3 Préparation du GSSE

Nous avons utilisé les déchets de vinification de la variété Carignan *Vitis Vinifera* (Grape seed and skin extract: GSSE). L'extrait de GSSE est produit à partir des résidus de vinification qui ont été obtenus à partir de la coopération vinicole d'Ain Ghelal de la région de Mateur (gouvernorat de Bizerte). C'est un extrait polyphénolique formé de 50% de pépins et 50% de pulpes. Le mélange est dissous dans l'éthanol 10% à raison de 1g de poudre dans 3ml d'éthanol 10%. Le mélange a été centrifugé à 3000tr/min pendant 15 min et le surnageant injecté aux animaux par voie intrapéritonéale (i.p).

1.1.4 Composition du GSSE

La teneur du GSSE en composés phénoliques totaux est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Ainsworth et Gillespie 2007). Les flavonoïdes et les tannins condensés sont dosés respectivement selon (Dewanto et al. 2002; Spranger et al. 2008). La composition du GSSE a été établie par l'analyse HPLC-MS/MS. La Chromatographie en phase liquide a été effectuée en utilisant un système Perkin Elmer série 200 équipé d'une micro-pompe binaire. Les analyses ont été effectuées sur une colonne de type C18 (Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 150 mm, particules taille 5 µm). La phase mobile était de l'acide formique à 0,1%.

1.2. Protocole expérimental

Les rats ont été subdivisés en 4 groupes : SD, SD+GSSE, HFD, HFD+GSSE. Ils ont été soumis à un régime SD ou HFD durant deux mois et quotidiennement injectés par voie (ip) avec du GSSE (co-traitement). Les animaux ont été traités avec une dose unique de 500mg/kg PC. Les rats témoins ont été quotidiennement injectés avec un volume équivalent d'éthanol 10%.

A la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés, le sang total collecté et le plasma recueilli pour le suivi d'un certain nombre de marqueurs systémiques de l'alimentation grasse. Les cerveaux des rats ont été collectés, broyés à l'aide d'un ultrathurax d'homogénéisation en tampon Tris base (TBS) 10mM, pH7, 4. Les broyats ont été centrifugés à 10000g/min pendant 20 min à 4°C, et les surnageants conservés à -20°C.

Les lipides tissulaires ont été dosés après extraction en présence d'un solvant d'extraction chloroforme-méthanol (2 :1, v/v) d'après la méthode de (Folch et Porter 1957). Après centrifugation à 3000g/min, on récupère à l'aide d'une pipette Pasteur la phase

chloroformique inférieure contenant les lipides qui est ensuite séchée dans un bain marie à 50°C.

2. Etude protéomique différentielle

2.1. Extraction des protéines

Les homogénats ont été ensuite dilués dans une solution de lyse dans un tampon IEF (Urée 7M (Acros), Thiourée 2M (Acros), DTT 65 mM (Acros), CHAPS 4% (Acros), TRIS HCL 0,04 % (ACROS) additionné de 100µl d'inhibiteurs de protéases (Roche)), puis soumis à des ultrasons à 4°C. Cette étape de sonication permet l'éclatement des cellules et la récupération de l'extrait protéique global. L'étape suivante est une centrifugation à 10000 rpm pendant 15 min afin d'éliminer les débris cellulaires résiduels suivi d'un dosage des protéines totales par la méthode de Bradford.

2.2 . Dosage des protéines totales

Pour ce dosage, 10 µl de l'extrait ajoutés à 500 µl d'une solution de Bradford (kit *Protein Assay*® ; Bio-Rad) diluée au 1/5. Après 30 min de réaction dans l'obscurité, l'absorbance à 595nm (A_{595}) est mesurée et la concentration protéique en µg/ml est déterminée en se référant à une courbe étalon réalisée avec une gamme de concentration de BSA (« Bovine Serum Albumin », Sigma-Aldrich).

2.3 Electrophorèse

Tous les produits et réactifs utilisés pour l'électrophorèse et le traitement des gels proviennent de Biorad sauf indication contraire.

2.3.1. Electrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de SDS (Sodium dodécylsulfate). Les gels SDS-PAGE sont constitués d'un gel de résolution à 12,5 % d'acrylamide et d'un gel de concentration à 5 % d'acrylamide (Tableau 7). Les échantillons protéiques sont repris dans du Laemmli 4X avec une concentration finale de 1X, puis chauffés 10 min à 100°C. Après une centrifugation pendant 10 secondes à 2000 g, 15 µl d'échantillon sont déposés dans les puits. Quatre µl d'un mélange de marqueur de poids moléculaire (LMW Molecular Weight Markers, Amersham) sont ainsi déposés sur le gel. La migration se fait sous agitation magnétique et en condition de refroidissement à une tension et puissance maximales et sous une intensité de 10 mA puis de 20 mA/gel (cuves Protean II xi

(BioRad). Le tampon de migration utilisé est composé de 72 g de glycine, 15,15 g de tris base et 5 g de SDS pour un volume de 5 litres.

Volume pour deux gels		
Produits	Gel de séparation	Gel de concentration
Acrylamide 40%	23,55 mL	1,384 mL
Bis-acrylamide 2%	12,57 mL	0,736 mL
Tris HCL, 1M, pH8.9	29,02 mL	1,522 mL
Eau milli Q	11,56 mL	8,37 mL
TEMED (6,6M) 76,7%	60,75 µL	39,75µL
Persulfate d'ammonium (APS) 10%	232,2 µL	60,9µL

Tableau 7: composition des gels utilisés pour la SDS-PAGE

➤ **Coloration des gels au nitrate d'argent**

Les gels sont incubés 45 min sous agitation dans un bain de fixation contenant 30 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique. Deux rinçages à l'éthanol 10 % suivit de 2 lavages à l'eau distillée sont effectués pendant 5 min sous agitation. Un bain de sensibilisation avec 0,02 % de thiosulfate de sodium est effectué pendant 1 min suivi d'un rinçage rapide à l'eau. Puis les gels sont colorés à l'argent (0,1 %) pendant 20 min à l'abri de la lumière toujours sous agitation. La révélation s'effectue pendant environ 20 min par une solution contenant du formaldéhyde (3,7 %), du carbonate de sodium (12 g/l), et du thiosulfate de sodium (0,08 %). Un bain d'arrêt est ensuite réalisé par une solution d'acide acétique 1 % pendant 3 min.

2.3.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2-DE)

L'2-DE a permis de séparer des protéines contenues dans un échantillon selon 2 dimensions de séparation orthogonales : la première basée sur leur pI et la seconde sur leur MW. La première dimension (focalisation isoélectrique) a séparé les protéines dans des bandelettes de gel d'acrylamide dans lesquelles règne un gradient de pH préformé (*Immobiline[®] Drystrip*, 18 cm, Amersham Pharmacia Biotech). Après une étape initiale de réhydratation des bandelettes

avec l'échantillon préparé, les protéines migraient à l'intérieur de la bandelette sous l'influence d'un champ électrique jusqu'au pH correspondant à leur pI, c'est à dire où la protéine présentait une charge électrique globale nulle. La seconde dimension était une électrophorèse classique SDS-PAGE, lors de laquelle les protéines étaient séparées selon leur masse. La présence de SDS uniformisait la charge de toutes les protéines et l'application d'un champ électrique permettait la migration des protéines à l'intérieur du gel réticulé.

a) Précipitation des protéines

Pour améliorer la résolution des gels, un kit a été utilisé, le « *2DClean-up®* » (GE Healthcare). Ce kit a permis d'éliminer les substances interférentes (détergents, sels, lipides ...) à l'origine des trainées horizontales souvent observées sur les gels. Ce kit contenait en fait les solutions nécessaires à la précipitation des protéines (adaptation du protocole de précipitation à l'acide trichloracétique). Pour 100 µl d'échantillon, 300 µl de précipitant étaient ajoutés puis le tout est incubé dans la glace pendant 15 min. Trois cents µl de co-précipitant étaient ajoutés et l'échantillon est alors homogénéisé puis centrifugé à 12000 g pendant 5 min. Après avoir éliminé le surnageant, le culot obtenu était resuspendu dans 25 µl d'eau milliQ. Cet échantillon était placé à température ambiante dans 1 ml de tampon de lavage (Wash Buffer) additionné de 5 µl d'une autre solution (Wash Additive) durant 30 min. Enfin, une dernière centrifugation était réalisée à 12000 g pendant 5 min. Le culot obtenu contenant les protéines a pu être resuspendu avec 396 µl de tampon IEF.

b) Réhydratation des bandelettes

Après le traitement avec le kit 2D clean-up, 8 µl d'ampholytes 4-7 ou 3-10 étaient ajoutés à la solution précédente suivant les bandelettes utilisées. La réhydratation des bandelettes a été réalisée de manière active avec le système *Protean IEF Cell* (Biorad). L'échantillon était déposé dans une cassette prévue à cet effet, puis était recouvert par la bandelette avec le coté gel sur l'échantillon. Cette bandelette était ensuite recouverte d'huile minérale (Biorad) afin d'éviter la cristallisation de l'urée. La réhydratation durait 10 h, durée pendant laquelle les protéines pouvaient diffuser librement au sein de la matrice polymérique.

c) Focalisation isoélectrique

La réhydratation et la migration s'effectuaient également avec le système *Protean IEF Cell®*. L'étape de focalisation suivait l'étape de réhydratation, sans qu'une manipulation des bandelettes n'ait été nécessaire. Lors de cette étape, la tension augmentait de façon linéaire pendant 3 heures pour atteindre un maximum de 10000 V. La migration s'arrêtait lorsqu'un

produit tension*temps de 90 kV/h est atteint. Après migration, les bandelettes ont été stockées sous plastique à -24°C, ou utilisées immédiatement pour la seconde dimension.

d) SDS-PAGE

Avant cette deuxième migration, il y a une phase d'équilibration des bandelettes. De plus, avant cette séparation, les protéines présentes au niveau de leur pI dans les gradients de pH immobilisés devaient être uniformément chargées. Les bandelettes étaient ainsi incubées pendant 10 min dans un tampon de rééquilibration (7,4 ml de tampon Tris-HCl pH 6,8 à 50 mM, 72 g d'urée, 60 ml de glycérol (Sigma-Aldrich), 4 g de SDS, eau distillée qsp 200 ml) dans lequel a été ajouté du dithiothréitol (DTT, 0,3 g dans 15 ml de tampon) qui a permis de réduire les ponts disulfures entre les cystéines. Les bandelettes étaient ensuite incubées 10 min dans un second bain de tampon d'équilibration mais en présence d'iodoacétamide (Biorad) (0,375 g dans 15 ml de tampon) qui alkylait les groupements thiols des protéines empêchant ainsi leur réoxydation. Dans un second bain, du bleu de Coomassie R-250 à 1% a été ajouté afin de servir de témoin de migration.

L'électrophorèse a été réalisée dans des gels d'acrylamide coulés entre deux plaques de verre de dimension 18 x 20 x 0,075 cm (système Biorad). Le gel se décomposait en deux parties, un gel de séparation à 12,5% d'acrylamide qui était recouvert par un gel de concentration à 5% d'acrylamide. Après les bains précédents, les bandelettes étaient déposées délicatement sur le haut des gels de concentration.

Les gels ont été ensuite placés dans des cuves d'électrophorèse contenant 4 L de tampon anodique : Tris-base 2,4 %; SDS 0,4 %; glycine 1,6 % et recouverts de tampon cathodique : Tris-base 0,3 % ; SDS 0,1% ; glycine 1,4% (produis provenant de chez Acros). La migration s'effectuait dans une cuve *Protean IIXi* (BioRad) à 4 °C pendant 45-60 min à 10 mA par gel pour la migration dans le gel de concentration puis à 20 mA par gel jusqu'à l'arrivée du front de migration au bas du gel. La migration et coloration des gels sont effectuées comme décrit précédemment.

2.4.Le Label-free

2.4.1. Préparation des échantillons

Trente microgrammes de protéines ont été repris dans 50 µl de tampon Lämmli (0,5 g SDS ; 2,5 ml glycérol ; 0,77 g DTT ; 5 ml β-mercapto-éthanol (Sigma-Aldrich) ; 25 ml de tampon TRIS 6,8 ; 0,1 ml bleu de bromophénol 1%). Après une brève centrifugation pendant 10 secondes à 2000 g, l'échantillon était déposé dans le puits d'un gel SDS-PAGE.

Les gels SDS-PAGE étaient constitués d'un gel de concentration à 7 % d'acrylamide (9,3 ml d'un mélange acrylamide/bisacrylamide ; 5 ml TRIS pH 6,8 ; 0,2 ml SDS 20 %; 0,4 ml APS 10 %; 0,04 ml TEMED, qsp 40ml H₂O). La migration se faisait sous agitation magnétique et sous refroidissement à une tension et une puissance maximales et sous une intensité de 10 mA/gel pendant 45 minutes puis de 20 mA/gel pendant 1 h (cuves Protean II xi (BioRad)). Le tampon de migration utilisé était composé de 72 g de glycine, 15,15 g de TRIS-base et 5 g de SDS pour un volume de 5 litres.

Après la migration, le gel est coloré avec une solution colloïdale de bleu de Coomassie pendant 30 secondes, puis décoloré par plusieurs bains de décolorant (acide acétique 10 %, éthanol 30 % et H₂O 60 %). Pour chaque puits, une fine bande contenant l'ensemble des protéines apparaissait pendant la décoloration. Ces bandes protéiques étaient ensuite découpées et placées individuellement dans un tube Eppendorf.

Puis trois étapes de lavage (80 µl H₂O pendant 10 min) et deux bains successifs de DTT (5 mM 50µl, 10 min), et d'iodoacétamide (25 mM 50 µl, 10 min) ont été réalisés. Par la suite, les gels ont subi deux lavages à l'aide d'un mélange à volume égal de tampon carbonate (25 mM) /acétonitrile et d'un bain d'acétonitrile (100 µl 10min). Les bandes ont été séchées à l'évaporateur-concentrateur (Speedvac) pendant 30 min. Puis, deux bains d'une solution de trypsine (5 µL de trypsine à 0,4 µg/µL (Promega) dans 95 µl de tampon carbonate (25 mM) étaient réalisés pendant 1 h30 à 37 °C afin de digérer les protéines en peptides. Lors de ces essais (30 ug de chaque échantillon), la concentration de la solution de trypsine était ajustée à 0,1 ug/ul. Enfin, les peptides ont été repris directement dans une solution d'acide formique à 0,01% afin d'être analysés par spectrométrie de masse après une évaporation suite à l'étape de protéolyse.

2.4.2. Spectrométrie de masse

Les échantillons ont été analysés sur un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific) équipé d'une source nano-ESI et couplé à une chaîne chromatographique nano-débit (Easy-nLC II, Thermo Scientific). Pour ces analyses, 1 µL de l'échantillon a été chargé sur la colonne d'enrichissement (Cap Piège C8, 0,5 x 2 mm, Michrom bioressources) à une pression de 200 bars dans 0,1 % FA. La séparation a été effectuée sur une colonne en phase inverse (C₁₈, L 153 mm, ID 5 µm, 100 Å, Nikkyo Technos). Le gradient de 300 µl de débit est le suivant : de 2 à 40% de tampon B (CH₃CN/0,1% AF) en 105 min, de 40 à 80 % de B en 4 min et 80% de B pendant 15 min (tampon A : H₂O/0,1% AF).

Le spectromètre de masse était utilisé en mode positif avec une tension de capillaire fixée à 1,5 kV et une température de la source fixée à 200 ° C. Les échantillons ont également été analysés par fragmentation CID à l'aide d'une méthode référencée « Top20 ». Le balayage MS initial était enregistré dans l'analyseur Orbitrap avec une résolution de 60000 sur une gamme de masse m/z 400-2000. Là aussi, les ions mono-chargés n'étaient pas sélectionnés. Les principaux paramètres généraux de spectrométrie de masse pour la fragmentation étaient les suivants: seuil de signal d'intensité pour la sélection du précurseur fixé à 500 (Q-value de 0,25 et temps d'activation de 10 ms). Lors de ces cycles d'analyses, les 20 ions précurseurs les plus intenses étaient sélectionnés pour l'étape de MS/MS. Les peptides cibles déjà sélectionnés pour la MS/MS ont été exclus de manière dynamique pendant 30 s. La fragmentation était survenue dans l'analyseur à piège à ions linéaire avec énergie de collision normalisée de 35 %. Dans l'analyseur Orbitrap, toutes les mesures ont été réalisées après calibration interne à l'aide du pic de m/z à 445,12002 correspondant à un polydiméthylcyclosiloxane (lock mass).

2.4.3. Identification des protéines

Les fichiers de données brutes ont été traités à l'aide du logiciel Proteome Discover (Thermo Scientific ; version 1.3). Les peptides ont été identifiés grâce à l'intégration du moteur de recherche Mascot (Matrix Science ; version 2.2) utilisé contre la base de données SwissProt (V55.6; 390696 séquences) restreint à la taxonomie *Rattus Norvegicus* (20009 séquences). Les paramètres suivants ont été utilisés: 1 clivage manquant et les modifications variables concernant la carbamido-méthylation (C) et l'oxydation (M). La tolérance de masse sur l'ion précurseur et les ions fils étaient respectivement de 10 ppm et de 0,5 Da. Les résultats étaient filtrés pour un taux maximal de faux positifs de 5%. Lors de ces analyses, uniquement les protéines identifiées par au moins deux peptides associés à un degré de confiance élevé (« High confidence ») ont été conservées.

2.4.4. Quantification relative par Progenesis LC-MS

Les données brutes (fichiers.raw) ont été traitées avec le logiciel Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics ; V4.0.4441.29989). La détection des pics MS permettait de générer une carte peptidique massique semblable à une carte d'2-DE avec les rapports m/z et les temps de rétention (RT) comme coordonnées (figure34). L'étape suivante consistait à aligner les profils obtenus, chaque signal (« feature », coordonnées m/z_i , RT_i) détecté lors de chaque séparation était aligné sur le signal correspondant d'une séparation choisie comme profil de référence. En premier lieu, 15 vecteurs étaient fixés manuellement pour servir de repères lors de

l'alignement. S'ensuivait un alignement automatique pour l'ensemble des signaux repérés sur l'ensemble des séparations. L'étape suivante était le « pick peaking » qui consistait à cartographier l'ensemble des pics, en leur attribuant une position, une abondance. Pour améliorer le confort de cette analyse, les pics pouvaient être visualisés dans différents repères (à une, deux ou trois dimensions). Les pics correspondant à des ions monochargés et aussi ceux de charge supérieure à 8 étaient écartés de l'analyse. A ce stade, l'abondance de tous les pics était normalisée, normalisation qui donnait lieu à un facteur unique pour chaque échantillon qui corrigeait les caractéristiques de l'échantillon.

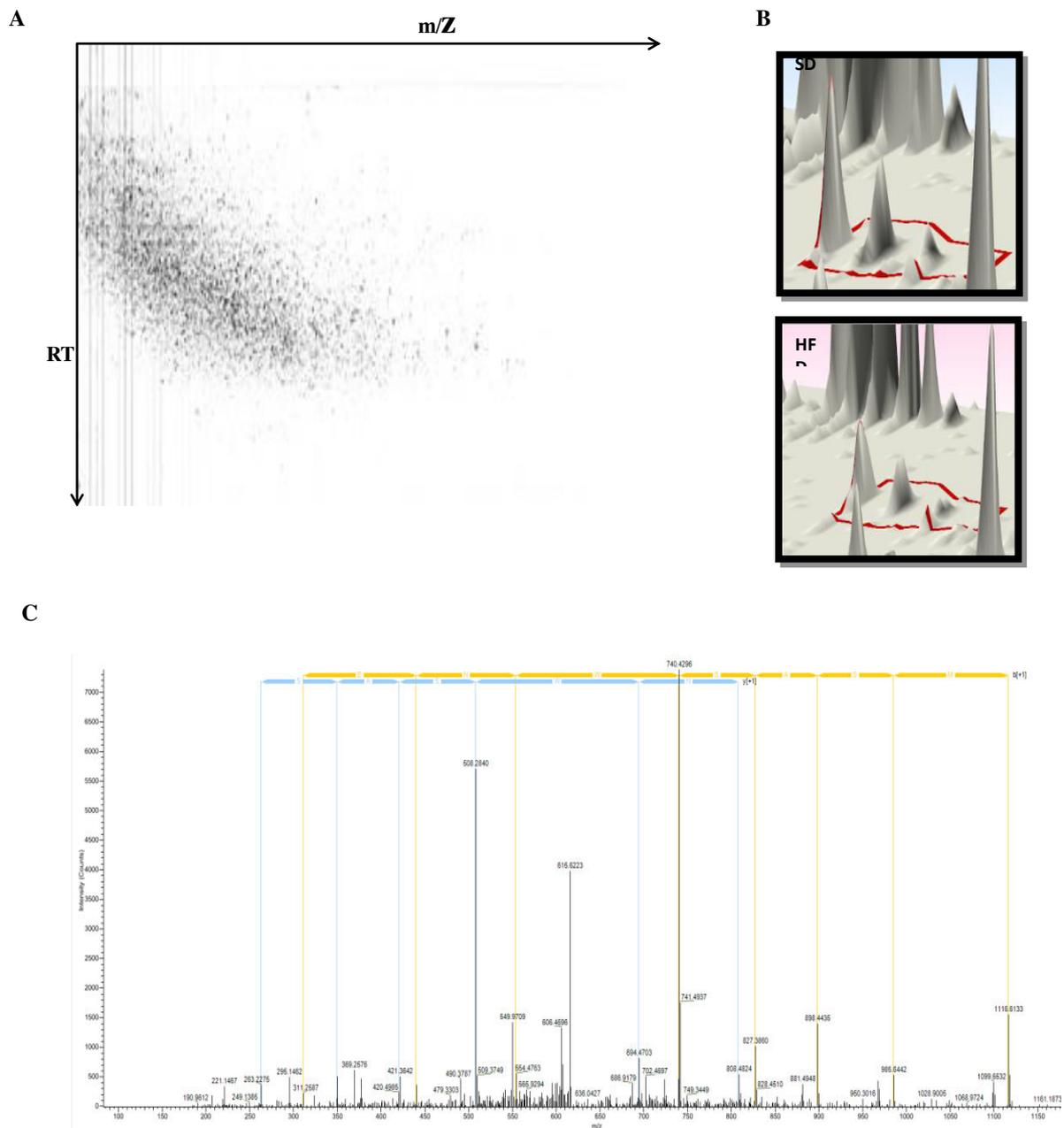


Figure 34: Principe de l'approche sans marquage « label free ».

Chaque mélange peptidique était analysé individuellement par spectrométrie de masse couplée à un système de chromatographie (A). Les profils obtenus étaient alors alignés sur une des expériences qui sert de référence et grâce à des étalons internes ajoutés à l'échantillon. Les intensités des pics peptidiques sur les spectres MS étaient alors suivis au long de leur élution. Une fois que ces peptides étaient repérés lors de chacune des expériences de LCMSMS, les rapports d'intensités établis selon l'aire des pics chromatographiques mesurés pour permettre la quantification relative (B). Une fois le peptide identifié (C), l'abondance des peptides uniques appartenant à une même protéine a été cumulé, alors l'abondance d'une protéine a été comparée entre les conditions.

Pour sélectionner les ions présentant un comportement significativement différent entre les échantillons SD et HFD, un test statistique par analyse de la variance (ANOVA) a été réalisé avec les abondances normalisées de l'ensemble des pics. Aucun rapport minimal de modification d'abondance (« fold change ») n'a été fixé pour la sélection des données à inclure pour la quantification. Les pics présentant une p-value inférieure à 0,05 (qui permet de rejeter l'hypothèse que les moyennes soient égales) et une q-value inférieure à 0,05 (fixant moins de 5% de faux positifs) ainsi qu'une valeur de puissance statistique de l'analyse supérieure à 0,8 (nombre de réplicats nécessaires) ont été sélectionnées et utilisées pour effectuer une analyse en composante principale (ACP). L'ACP a consisté à transformer des variables liées entre elles (dites "corrélées" en statistique) en nouvelles variables décorréliées les unes des autres, des axes principaux. Ainsi, en sélectionnant uniquement les ions présentant une abondance significativement différente entre les deux populations, cette approche géométrique a permis de discriminer distinctement en deux groupes ou plus tels que les populations SD et HFD.

Lorsqu'ils étaient présents, les spectres MS/MS des ions sélectionnés étaient exportés au format générique de Mascot (fichiers.mgf) et utilisés pour l'identification des peptides via Mascot avec des paramètres de recherche identiques à ceux décrits ci-dessus. Tous les peptides identifiés étaient sélectionnés s'ils présentaient un score d'identification supérieur à 20 (seuil d'identité de Mascot) et s'ils étaient protéotypiques (signature d'une protéine unique). L'abondance totale de la protéine a été calculée en additionnant les abondances de tous les peptides retenus. Une seconde ANOVA a été réalisée cette fois-ci avec les abondances relatives de chaque protéine pour chaque échantillon afin d'établir un rapport d'expression différentielle des protéines.

3. Analyses biochimiques

3.1. Dosages enzymatiques

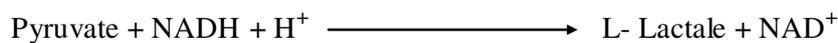
3.1.1. Lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate (ou l'inverse selon l'isoforme) avec conversion concomitante du NADH et du NAD⁺.

La LDH a été dosée à l'aide d'un kit commercial (Bio-Maghreb), utilisant un dosage spectrophotométrique.

➤ Principe

La LDH catalyse la réaction suivante :



En présence de pyruvate et de NADH/H⁺ la LDH produit du lactate et le NAD⁺. Cette cinétique peut être évaluée à l'aide du NADH, en effet le NADH absorbe à 340 nm et par conséquent l'activité de la LDH a été évaluée en suivant la diminution du NADH.

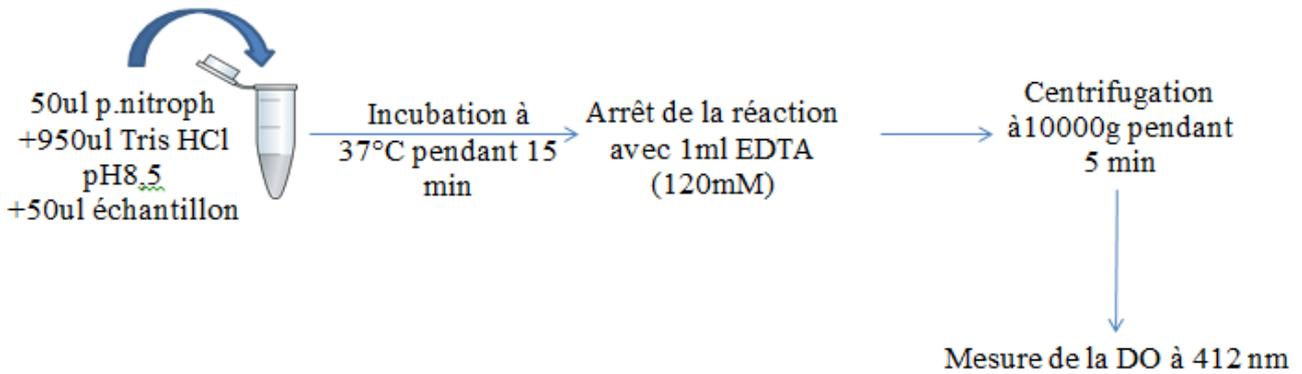
$$\text{Activité LDH} = \text{DO}/\text{min} \times 8095 \text{ (U/l)}$$

3.1.2. la L-tyrosinase

L'activité de la tyrosinase a été mesurée en utilisant le protocole de dosage de cette enzyme dans les champignons avec quelques modifications. Dans un tampon phosphate PH6.8 (50 mmol/l) auquel on rajoute 20ul DOPA et le volume de l'échantillon. Une coloration due au dopachrome formée est ainsi mesurée à une longueur d'onde de 450nm après une incubation du mélange réactionnel à 37°C pendant deux heures. L'activité est ensuite reportée aux différentes concentrations des échantillons.

3.1.3. Lipase

L'activité de la lipase a été mesurée par la transformation du p-nitrophénol dodecanoate selon (Humbert, Guingamp, et Linden 1997). Les échantillons ont été incubés dans un mélange contenant de l'EDTA (0,06M) et le NaOH (2M) pH 7,6 pendant 15 min à 37°C, puis le réactif (P-nitrophényle dodécanoate) a été ajouté. Le mélange a été incubé 3 min à 37°C puis la densité optique a été mesurée à 420 nm.



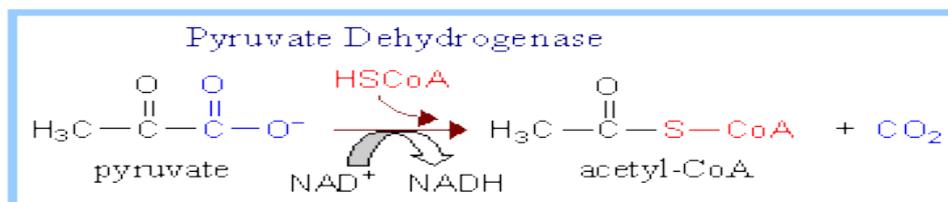
1unité \longrightarrow 1umol de p-nitrophenol

3.1.4. Glucose-6-phosphatase

Le dosage de la G-6-phosphatase est effectué en présence d'un tampon KCl additionné de molybdate dissout dans du HCl 2N (2/3v), acide ascorbique 10% (1/9v) et du SDS 10% (2/9v). Selon (Minassian, Montano, et Mithieux 1999), la G-6-phosphatase est mesuré par ajout de son substrat le G6P (le glucose-6-phosphate) et par mesure l'absorbance (DO à 820nm) représentant la disparition du substrat au cours de la réaction. Le calcul de l'activité G-6-phosphatase fait par calcul de la pente d'une gamme étalon de KCl par rapport à la quantité de protéines dans les différents échantillons.

3.1.5. Pyruvate déshydrogénase

La PDH intervient pour catalyser la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA selon la réaction suivante :



Pour mesurer l'activité PDH dans les cerveaux de rat, un dosage spectrophotométrique a été effectué en se référant à la méthode de Chretien et al. (1995) avec quelques modifications apportées. Il s'agit de suivre la réduction de NAD⁺ en NADH à 340nm. Pour ce faire, un tampon phosphate 50mM pH 7.4, le pyruvate de sodium (substrat), une solution de NAD⁺ (0.5mM) et l'enzyme ont été utilisés pour démarrer la réaction. L'activité pyruvate déshydrogénase est ensuite mesurée en U/min/mg de protéines de cerveau.

3.1.6. Les Calpains

Ce dosage consiste à évaluer l'activité des calpains qui sont des protéases calcium dépendantes qui catalyse plusieurs réactions telles que la dégradation de la protéine kinase C.

➤ Principe

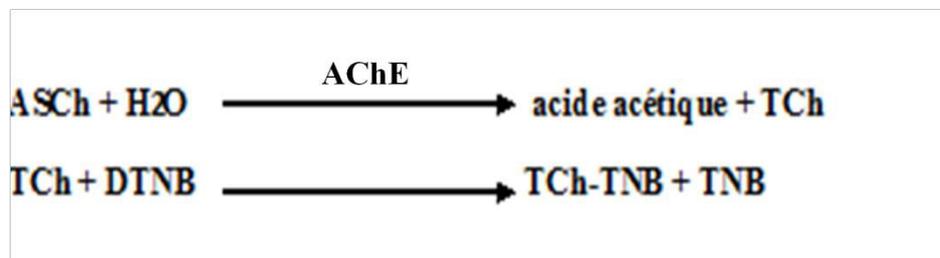
En présence de calpains le substrat N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-méthylcoumarin est clivé, et libère un fluochrome qui absorbe à 360nm et qui émet à 460nm.

Les extraits de cerveau sont incubés pendant 10 minutes dans un tampon contenant l'imidazole-HCl (63 mM), β -mercaptoéthanol (10mM) et le CaCl_2 (5mM). Le substrat a été par la suite ajouté à raison de 200 μM et la fluorescence a été mesurée toutes les 10min pendant 40min. L'activité non dépendante du calcium a été mesurée dans les mêmes conditions en utilisant un tampon contenant de l'EDTA (10mM). Les résultats obtenus sont exprimés en fluorescence par min par mg de protéine.

3.1.7. L'acétylcholinestérase

➤ Principe du dosage

Les acétylcholinestérases sont mesurées en utilisant un analogue du substrat naturel, l'acétylthiocholine (ASCh) qui est hydrolysée par les acétylcholinestérases (AChE) en thiocholine (TCh) et acide acétique. La thiocholine libérée est révélée en utilisant le réactif D'ELLMANN (ELLMANN et al., 1961) ou DTNB (acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)) qui permet de titrer les fonction thiols (-SH). Le produit final mesuré par absorption à 412 nm est le 5-thiol-2-nitrobenzoate (TNB) résultant de l'attaque du DTNB par la thiocholine, donnant un produit annexe, la 4-thiocholine-5-thio-2-nitrobenzoate (TCh-TNB).



➤ Protocole expérimental

SOLUTIONS	COMPOSANTS ET MASSES MOLAIRES	MASSE A PESER	VOLUME FINAL DE SOLUTION	COMMENTAIRES
TAMPONS PHOSPHATE à pH 7 et 8 0.1 mol/L	KH ₂ PO ₄ à 0.1 mol/L (136.09 g/mol)	6.8 g	500 mL d'eau distillée	-à conserver à 4°C -A 200 mL de K ₂ HPO ₄ (base), ajouter la quantité suffisante de KH ₂ PO ₄ (acide) pour obtenir un pH de 7 ou 8.
	K ₂ HPO ₄ à 0.1 mol/L (174.2 g/mol)	8.71 g		
DTNB 0.01 mol/L	DTNB (396.3 g/mol)	11.9 mg	3 mL de tampon phosphate pH 7	-préparer extemporanément -conserver à l'abri de la lumière
ASCH 0.075 mol/L	ASCH (298.2 g/mol)	44.6m g	2 mL de tampon phosphate pH 8	-préparer extemporanément -conserver à l'abri de la lumière

Une modification du protocole a été effectuée après que l'on a observé un problème d'instabilité réactionnelle. En effet, (Scaps et al. 1997) observent qu'il faut utiliser 2 pH différents car le DTNB est instable à pH 8 tandis que la réaction enzymatique est optimale à pH 8. Le DTNB est donc préparé à PH 7 et l'ASCh à pH 8.

On passe ensuite les échantillons sur microplaques

	BLANCS	ECHANTILLONS
Echantillon	0 µL	10 µL
Tampon Phosphate pH 8	260 µL	250 µL
DTNB	20 µL	20 µL
ASCh	20 µL	20 µL

Remarque : La lecture sur microplaques doit se faire tout de suite après avoir mis l'ASCh car la réaction est immédiate.

- Calcul de l'activité de l'ACHÉ

L'activité AChE est exprimée :

Soit en unité arbitraire : 1 unité=0.001 Δ DO/min/mg protéines (Galgani et Bocquene 1990).

Soit en nmole/min/mg prot

$$AV = [(\Delta DO/min) / \varepsilon \times l] \times (V_{tot} / V_{enz}) \times 1000$$

ε : représente le coefficient d'extinction moléculaire, $\varepsilon = 13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

l : trajet optique de la cuve, l = 0,779 cm

Résultat en nmol/min/mg de protéines (d'où le facteur 1000)

3.1.8. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée en utilisant le test statistique test t de Student. Toutes les données ont été exprimées en moyenne \pm l'erreur type ($M \pm \text{SEM}$).

Avec $M = \Sigma x / n$; x signifiant la valeur du paramètre étudié et n c'est le nombre de valeurs.

Le SEM = écart type / \sqrt{n} . Pour la comparaison des valeurs nous avons utilisé le test ANOVA.

La différence est significative pour $P < 0.05$ (*).

La différence est hautement significative pour $P < 0.01$ (**).

3.2 Marqueurs du stress oxydatif

3.2.1. Activités antioxydantes

a. Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

Le protocole de dosage de l'activité SOD a été décrit dans un premier temps par (Czeplédi, Zsoldos, et Mózsik 1984) puis repris plus tard par (Kakkar, Das, et Viswanathan 1984).

➤ Principe

En présence de la catalase bovine l'épinéphrine est oxydée et forme des adénochromes qui absorbent à la longueur d'onde $\lambda = 480 \text{ nm}$. Cette technique repose sur la capacité de la SOD à inhiber l'oxydation de l'épinephrine, en piégeant le flux d'anion superoxyde. L'activité de la SOD dans les échantillons est évaluée par spectrophotocolorimétrie, en suivant pendant 5 min

la cinétique de l'inhibition de la formation de l'adénochrome et en la comparant au témoin où l'oxydation de l'épinéphrine est totale.

Les résultats sont exprimés en Unité SOD/min/mg de protéines.

b. Dosage de la catalase

La catalase est une protéine héminique qui catalyse la transformation de l'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



➤ **Principe**

La catalase catalyse la réaction de réduction du peroxyde d'oxygène en eau, la cinétique de cette réaction est déterminée en suivant la quantité de peroxyde d'oxygène dans le milieu. En effet le H_2O_2 absorbe à une longueur d'onde $\lambda = 240 \text{ nm}$, et par conséquent la cinétique enzymatique est suivie par spectrophotométrie pendant 3 min et l'activité de la catalase est proportionnelle à la diminution de la DO à 240 nm.

L'activité de la catalase est calculée comme suit :

Activité de la catalase = $\text{DO } 0 \text{ min} - \text{DO } 3 \text{ min} / 3 * L * V$ en (Unité CAT/mg prot/min)

ϵ : coefficient d'extinction molaire de = $0,036 \text{ Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$

L : longueur du trajet optique = 1 cm

C : concentration du surnageant en catalase

V : volume de la prise d'essai

Les résultats sont exprimés en unité de catalase/min/mg de protéines.

3.2.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'oxygène a été dosé par la méthode enzymatique. Le H_2O_2 est réduit en eau par les peroxydases suivant la réaction suivante :



La quantité de quinoneimine (de couleur rose) est mesurée par spectrophotométrie à 505 nm et la quantité de H_2O_2 est déterminée grâce à une gamme étalon.

3.2.3. Dosage du calcium

Le calcium a été dosé dans le cerveau à l'aide d'un kit commercial qui nous a été fournis par Bio-Maghreb, en utilisant la méthode colorimétrique.

➤ **Principe :**

Le calcium forme avec le complexant crésolphtaléine en milieu alcalin un composé coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium. La densité optique est mesurée à $\lambda = 570$ nm et la quantité de calcium dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une gamme étalon

3.2.4. Dosage du lactate

Le lactate joue un rôle primordial dans plusieurs processus biologiques. Des concentrations élevées en lactate ont été reliées à un état pathologique comme le diabète et l'acidose lactique. La forme la plus retrouvée dans le métabolisme humain est le L(+) lactate qui est présent dans le sang. Le dosage du lactate est un dosage colorimétrique qui a été effectué par un kit utilisé afin de détecter le L(+) lactate. Dans ce kit, il y a oxydation du lactate par la LDH dont le produit généré interagit avec une sonde pour donner une coloration qu'on mesure à une longueur d'onde max de 450nm.

4. Validation des résultats par Western blot

Le western blot est une technique semi-quantitative permettant la détection et l'étude de l'expression d'une protéine spécifique sur une membrane. Elle se déroule en 3 étapes: électrophorèse, transfert et révélation. Les protéines sont séparées en fonction de leur taille par électrophorèse, puis elles sont transférées sur une membrane où elles sont détectées par des anticorps. La révélation est enfin réalisée par fluorescence.

Cette technique a été utilisée pour étudier l'expression de plusieurs protéines (Tableau 8).

4.1 Electrophorèse SDS-PAGE et transfert

Les échantillons (de 5 à 20 μg /puits de protéines microsomaux) ont été dénaturés 5 min à 95°C dans du tampon Laemmli (glycérol 60 %, Tris 2 M pH 6,8, SDS 10 %) (Laemmli, 1970), soumis à électrophorèse sur un gel de SDS-PAGE 10%. Après dépôt des échantillons, la migration est effectuée à 100 Volts (V) pendant 2h à l'aide du tempon de migration (tableau 9B), jusqu'à la sortie du front de migration à l'extrémité inférieure du gel. Dans notre étude, on a utilisé des gels SDS pré coulés pour la migration des protéines.

Afin de détecter les protéines par les anticorps, elles sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose. Le transfert se fait en semi-sec. La membrane est placée face au gel, entre deux couches de papier absorbant Whatman. Un courant électrique est appliqué aux plaques de façon à ce que les protéines du gel chargées négativement migrent vers la borne positive sur la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Il résulte de ce transfert que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures (Burnette 1981b). La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines. Le transfert se fait pendant 20 min dans une cassette de transfert à 50 V.

4.2 Révélation

Après transfert, les sites non spécifiques de la membrane sont saturés par de la BSA 2% soit par du lait 5% -TBS/Tween 0.1% pour limiter une fixation non spécifique des anticorps. La saturation est réalisée pendant 1h, sous agitation à température ambiante. Après saturation de la membrane, les protéines ont été hybridées avec l'anticorps primaire approprié dirigé contre la protéine d'intérêt. Les membranes sont par suite incubées avec l'anticorps secondaire dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est dilué dans la BSA 2% soit dans le lait 5% -TBS/Tween 0.1% et incubé avec la membrane pendant 1 h, à l'obscurité, sous agitation à température ambiante.

L'anticorps secondaire est un anticorps fluorescent qui, à une longueur d'onde spécifique, émet une fluorescence directement proportionnelle à la quantité d'anticorps fixé et donc de protéines reconnues.

L'acquisition des résultats est ensuite réalisée grâce au système Odyssey FC Imaging System 2800 (Li-cor Science Tec, USA) qui détecte la chimioluminescence. L'image ainsi enregistrée peut ensuite être analysée à l'aide du logiciel Image J (NIH, USA) qui permet de quantifier la densité des bandes d'expressions protéiques et ainsi permettre une comparaison semi quantitative entre les échantillons. Une analyse statistique est réalisée en utilisant le test t de Student. Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0.05$. Une approximation sur la taille des protéines étudiées est réalisée en comparant les bandes marquées à celles des marqueurs de masse moléculaire de la gamme étalon Benchmark Prestain Protein Ladder (Invitrogen) chargé durant l'électrophorèse. Une quantification des protéines totales de chaque échantillon déposé a été effectuée pour servir de contrôle.

Les anticorps sont utilisés comme outils de détection possédant à la fois une bonne sensibilité et une bonne spécificité, se liant directement à la protéine d'intérêt. La spécificité et le facteur de dilution pour lesquels la détection sera la plus fiable doivent être vérifiés pour chaque anticorps.

Protéines cibles	Masse moléculaire	Anticorps primaire (AC I)	Dilution de l'Anticorps I	Anticorps II
VDAC	31 KDa	Anti- VDAC BioVision (3594-100) Polyclonal rabbit	1/1000	Anti-Rabbit (IRD : 700)
PPARG	52 KDa	Anti PPARG (anticorps-enligne) Polyclonal rabbit	1/500	Anti-Rabbit (IRD : 700)
GAPDH	41 KDa	Anti GAPDH (Biorad) Monoclonal mouse	1/750	Anti- mouse (IRD: 800)
Enolase1	50 KDa	Anti Eno 1 (Biorad) Monoclonal mouse	1/100	Anti- mouse (IRD: 800)

Tableau 8: Anticorps utilisés en western blot.

A

B

Tampon d'échantillon 4X		Tampon de migration	
Tris HCl 0,5M pH6,8	0.909 gr	Tris HCl	25 mM
Bleu bromophéno 0,5% 0.075 gr		Glycine	192 mM
SDS 10%	1.5 gr	SDS	0.1 %
Saccharose 20%	3 gr		
B mercaptoéthano 125%	3.75 ml		
H ₂ O	15 ml		

Tableau 9: Compositions des tampons d'un gel SDS

3^{ème} partie

Résultats

Partie 1 : Approches physicochimiques et biochimiques

1. Effet du HFD et du GSSE sur les paramètres anthropométriques

1.1. Composition du GSSE

Les niveaux des composés phénoliques trouvés dans la poudre des graines et de la peau du raisin de type Carignan sont donnés dans le tableau 10. Les phénols totaux et les flavonoïdes sont légèrement plus élevés dans les graines que la peau, alors que les tannins condensés sont beaucoup plus élevés dans les peaux (3 fois). Parmi les 15 composés phénoliques identifiés dans les graines et les peaux, seulement l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque, caféique et férulique étaient plus abondants dans la peau que dans les graines (tableau 11).

Composés phénoliques	Graines	Peau
Total phenolics(mg/g extract)	67	51
Total Flavonoïds (mg/g extract)	16	14
Non flavonoïds (mg/g extract)	51	37
Condensed tannins (mg/g extract)	1.22	3.43
Total anthocyanins (µg/g extract)	0.997	0.962

Tableau 10: composition du GSSE de Carignan en polyphénols totaux

Compounds	m/z negative mode [M-H] ⁻	MS ² fragment	Relative abundance (%)	
			Seed	Skin
Catechin	289	245/108.8/ 122.8	2.27	0.36
Epicatechin	289	245/108.8/ 122.8	2.85	0.37
Procyanidin dimer	577	289.3/407.4	0.47	ND
Procyanidin trimer	865	577	ND	ND
Quercetin	301	150.8/120.9	0.64	0.47
Resveratrol	227	184.6/143	0.14	ND
Rutin	609.19	300.1	1.51	0.5
Vanillin	151.14	135.7/108.1	10.67	7.75
Gallic acid	169	124.7/78.9	50.3	32.77
P-coumaric acid	163	119/93	ND	0.38
Rosmarinic acid	359.2	160.8/197.1	ND	0.75
2,5-dihydroxybenzoic acid	152.7	108.7/90.7	30.58	51.96
Caffeic acid	179	135	ND	2.8
Chlorogenic acid	353	191	ND	0.34
Ferulic acid	193	134/89	0.55	1.46

Tableau 11: Analyse par LCMS/MS de quelques composés phénoliques trouvés dans le GSSE du Carignan

1.2. Poids corporel

Le suivi régulier (toutes les semaines) de l'évolution du poids corporel (PC) pendant 8 semaines, chez les 4 groupes de rats, nous a permis de dresser des courbes représentatives de l'évolution du PC ainsi que d'évaluer le gain pondéral absolu durant cette période de traitement.

Nos résultats montrent que l'alimentation HFD induit une augmentation significative du PC des animaux entre le premier et le dernier jour (figure 35 A). En effet le PC passe de 179.4 ± 1.523 g à 243 ± 0.689 g chez les rats témoins et de 182.8 ± 1.256 g à 280.4 ± 1.453 g chez les rats recevant un régime HFD.

L'administration intra-péritonéale de GSSE ramène significativement le PC des rats recevant un régime HFD à la normale. En effet, il passe de 280.4 ± 1.453 g à 252 ± 0.576 g. Les valeurs du gain absolu en poids corporel varient dans le même sens. En effet, ce gain qui consiste en la différence entre le poids final et le poids initial, est respectivement de l'ordre de 63.6 ± 1.256 , 42.8 ± 1.321 , 92 ± 2.348 et 69.1 ± 0.589 pour les rats SD, SD+GSSE, HFD et HFD+GSSE (figure 35 B).

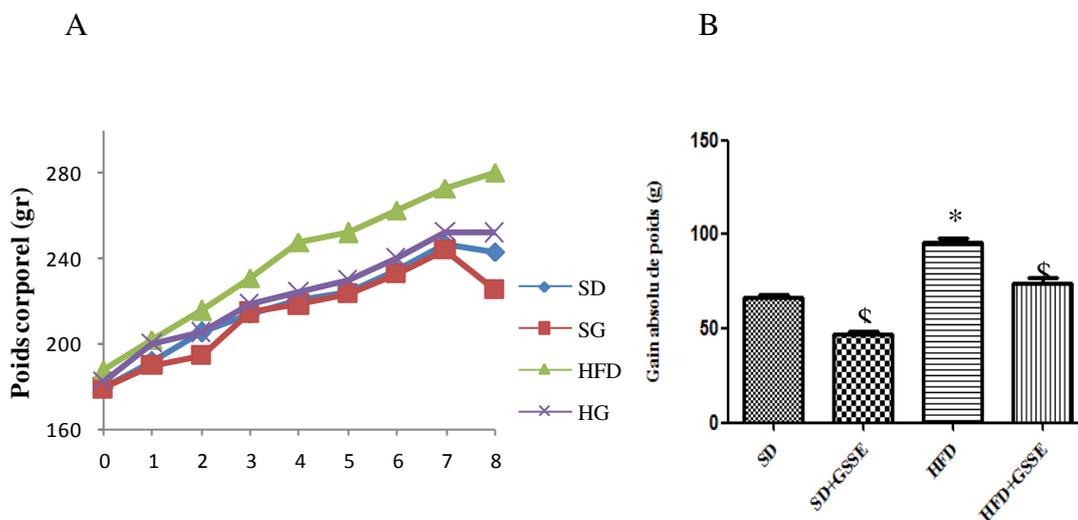


Figure 35: effet du GSSE sur l'évolution du poids corporel (A) et du gain de poids des rats (B).

*GSSE: Grape seed and skin extract; SD: standard diet; HFD: High fat diet. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM avec $n=5$ pour chaque groupe ; SD vs HFD : $**p<0.001$; HFD vs HFD+GSSE : $$$<0.001$.*

Cependant, les rats recevant un régime standard et traité par le GSSE, ne montrent pas de différences significatives concernant leur poids corporel, et ce par rapport aux contrôles n'ayant pas reçu de traitement au GSSE.

1.3. Poids relatifs du cerveau et du tissu adipeux

La figure montre qu'une alimentation riche en graisse HFD, pendant 60 jours, induit une hypertrophie du tissu adipeux (36 A) alors que le poids relatif du cerveau reste inchangé (36 B). En effet, on observe une augmentation significative du poids relatif du tissu adipeux de l'ordre de 51% (1.7 ± 0.005 contre $2.85 \pm 0.014 \text{g}/100 \text{g PC}$). Cette hypertrophie est corrigée par le traitement avec le GSSE. Toutefois, le GSSE n'a pas d'effet sur le poids relatif du tissu adipeux chez les animaux recevant une alimentation standard (SD).

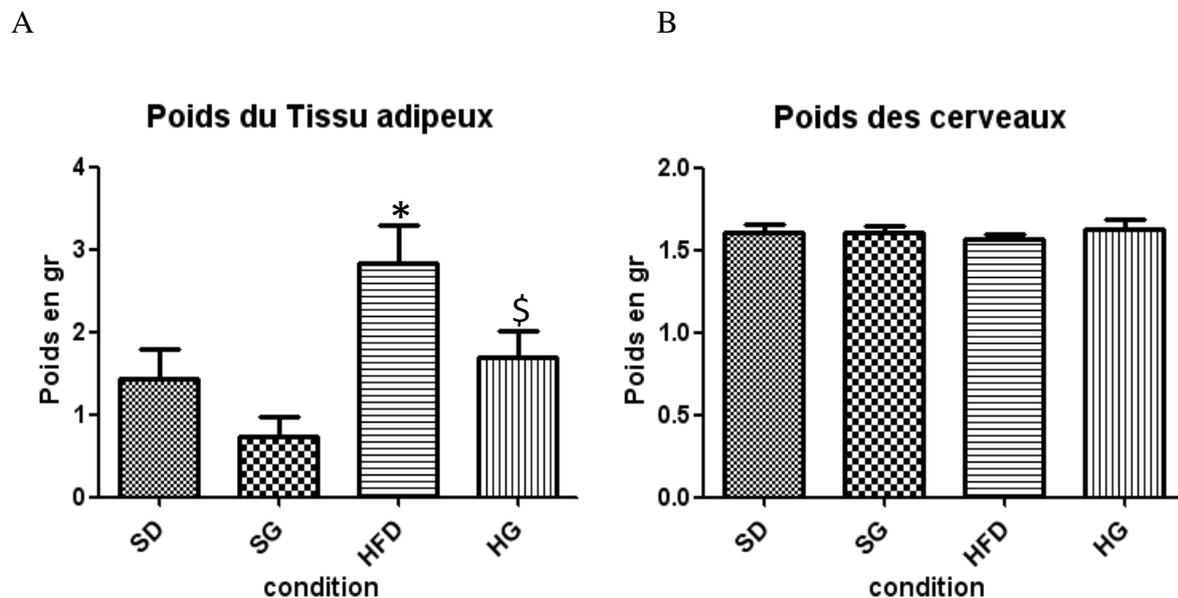


Figure 36: Effet du GSSE sur le poids relatifs du tissu adipeux et du cerveau

*GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat diet; SD: standard diet. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM avec $n=5$ pour chaque groupe ; SD vs HFD : * $p < 0.05$; HFD*

2. Effet du HFD et du GSSE sur l'enzymologie cérébrale

2.1. Effet du GSSE sur l'activité LDH

Le lactate déshydrogénase est une enzyme clé du métabolisme énergétique, vue son implication dans la production du lactate qui est la principale source d'énergie des neurones.

De ce fait nous nous sommes intéressés à voir l'effet du co-traitement au GSSE lors d'un traitement riche en gras (HFD) pendant 2 mois sur l'activité de cette enzyme.

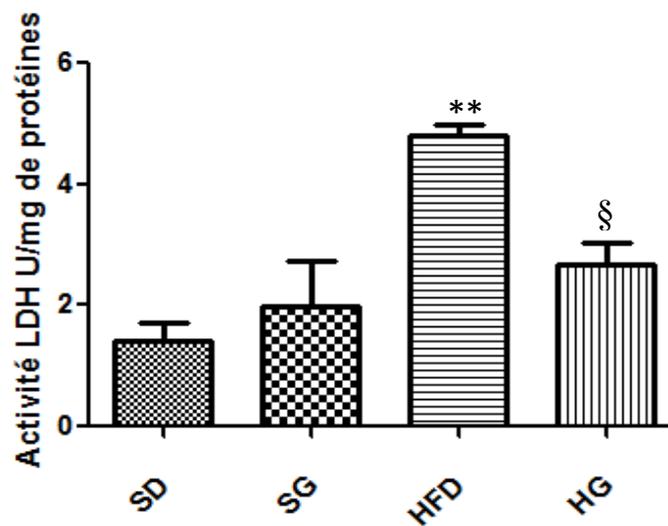


Figure 37: Effet du GSSE sur l'activité LDH cérébrale

*GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. HFD vs SD : ** $p < 0.001$; HG vs HFD: § $p < 0.05$*

Le dosage de la LDH cérébrale nous montre qu'après 60 jours de traitement des rats avec un régime riche en gras, cette activité enzymatique atteint le double de l'activité LDH au niveau des cerveaux du lot contrôle (SD) avec une différence hautement significative. Le traitement au GSSE corrige cette augmentation. En effet, la différence de l'activité LDH est significative entre le groupe HFD et HG (HFD+GSSE). Ceci montre bien l'effet correcteur du GSSE qui a diminué l'activité LDH dans les cerveaux de rats HG et l'a rapproché des valeurs du lot SD.

2.2.Effet du GSSE sur l'activité de la L-tyrosinase

La L-tyrosinase est une enzyme impliquée dans la synthèse indirecte des neurotransmetteurs. En effet, elle est considérée comme enzyme clés dans la synthèse de la mélanine dans la peau et les cheveux ainsi que la neuromélanine dans le cerveau. Cette enzyme a un rôle crucial dans le phénomène de la formation de la mélanine en intervenant dans deux étapes limitantes de la mélanogenèse.

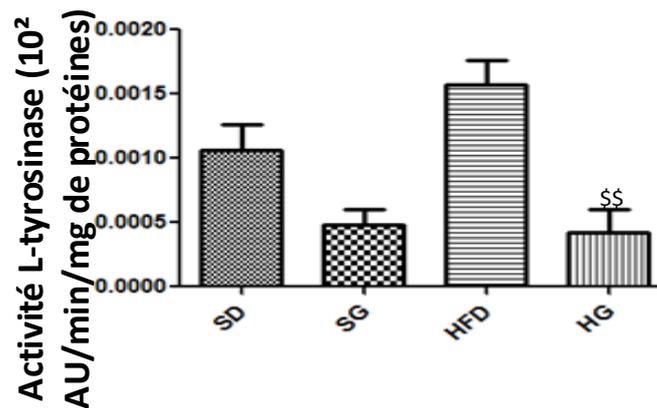


Figure 38: Effet du GSSE sur l'activité L-tyrosinase cérébrale

GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: high fat diet; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5). La différence des données a été déterminée par le test ANOVA. HFD vs HG : \$\$ p<0.001

L'analyse des résultats montre une augmentation non significative de l'activité tyrosinase par le traitement riche en gras (HFD). Par contre une diminution très significative (-65%) de cette même activité tyrosinase est observée suite au traitement des rats avec le GSSE. Le traitement des rats obèses avec le GSSE ramène ces taux vers des valeurs proches du régime normal (SD).

2.3.Effet du GSSE sur l'activité de la lipase

En étudiant l'effet du GSSE sur la lipotoxicité cérébrale, il nous est apparu pertinent de mesurer l'activité lipasique. En effet, les lipases (E.C. 3.1.1.3) jouent un rôle primordial dans la régulation des voies de signalisation lipidique. Ces enzymes hydrolysent les fonctions esters de glycérides en glycérol et en acides gras. Leurs activités au niveau du cerveau a été déterminée selon Humbert, Guingamp, et Linden (1997) utilisant le P-nitrophényle dodécanoate comme substrat.

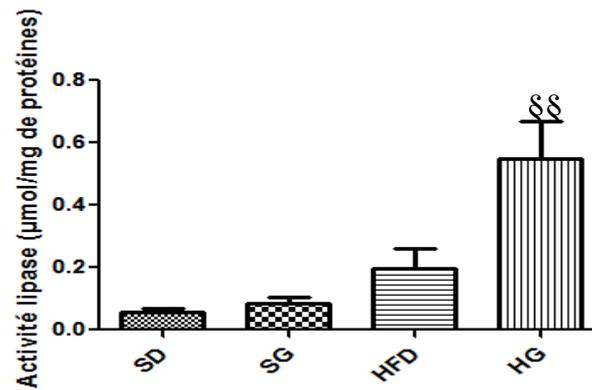


Figure 39 : Effet du GSSE sur l'activité lipase au niveau du cerveau

GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: high fat diet; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. HFD vs HG : §§ $p < 0.001$

2.4.Effet du GSSE sur l'activité de la glucose-6-phosphatase

Alors que tous les tissus et cellules de l'organisme sont capables d'utiliser le glucose, seuls le foie, les reins et l'intestin sont capables de produire du glucose. Ceci est lié à l'expression dans ces tissus d'une enzyme spécifique, la glucose-6-phosphatase, qui permet l'hydrolyse du glucose-6-phosphate (G6P) en glucose. Le glucose ainsi produit peut alors être libéré dans la circulation sanguine et dirigé vers d'autres tissus ou cellules dont l'activité fonctionnelle est totalement (érythrocytes, rétine...) ou partiellement (cerveau) dépendante du glucose. Une production normale de glucose est essentielle en période interprandiale (jeûne nocturne) pour le maintien de la glycémie dans ses limites physiologiques. L'utilisation du glycogène se fait différemment au niveau du foie et du muscle squelettique. En effet, du fait de la présence de la glucose-6-phosphatase dans le foie, ce tissu pourra largement participer au contrôle de la glycémie (75% du glucose libéré dans la circulation). Dans le muscle en revanche, le glucose-6-phosphate formé par la glycogénolyse servira de substrat au muscle lui-même via la glycolyse.

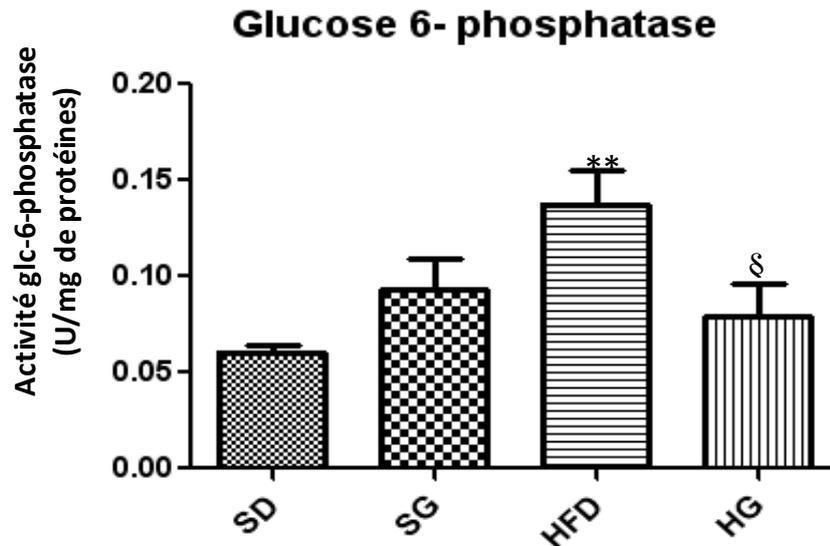


Figure 40: Effet du GSSE sur l'activité G-6-phosphatase

*GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: high fat diet; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs HFD : ** $p < 0.001$, HFD vs HG : § $p < 0.05$.*

L'effet du HFD sur l'activité G-6-phosphatase est illustré dans la figure 40. L'analyse des résultats montrent que l'activité de cette enzyme enregistre une augmentation très significative au niveau des cerveaux de rats recevant un régime enrichi en graisse.

Le GSSE ramène significativement l'activité G-6-phosphatase des rats obèses à des valeurs comparables au SD.

2.5.Effet du GSSE sur l'activité du pyruvate déshydrogénase

Le pyruvate déshydrogénase (PDH) est une enzyme clé de la chaîne respiratoire qui relie la voie de la glycolyse avec celle du cycle de l'acide tricarboxilique. Cette enzyme est considérée comme marqueur des voies métaboliques du glucose et des lipides. La mesure de l'activité PDH dans les cerveaux de rats nous renseigne sur l'effet du traitement effectué sur la lipotoxicité cérébrale.

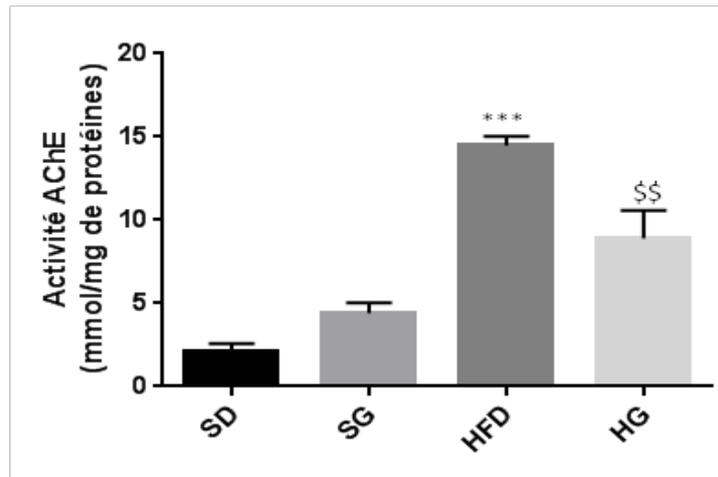


Figure 41 : Effet du GSSE sur l'activité PDH

GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: high fat diet; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. HFD vs HG : $\$ p < 0.05$

2.6.Effet du GSSE sur les calpains

Les calpains sont des protéases calcium dépendantes qui catalysent la dégradation de plusieurs molécules indispensables à la survie cellulaire. Elles sont très impliquées dans les processus de mort cellulaire lors d'un stress oxydatif.

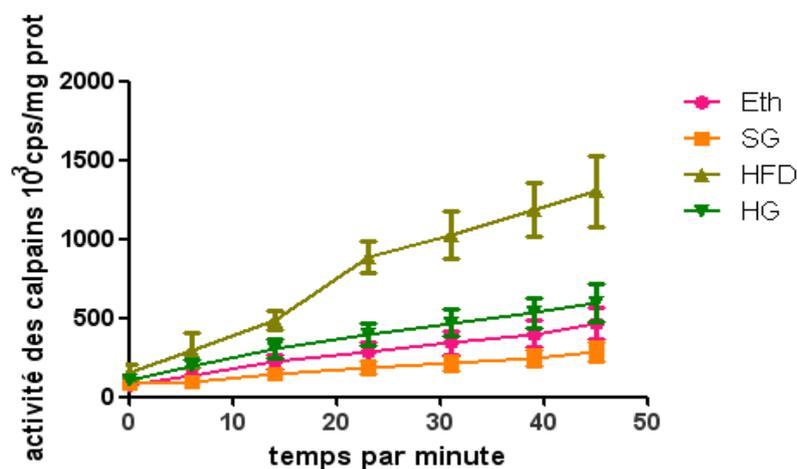


Figure 42: Variation de l'activité des calpains au niveau du cerveau chez les 4 lots de rats après 60 jours de traitement au gras et au GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5 rats/lot).

Les résultats du dosage de l'activité des calpains nous montre que les cerveaux SD (Eth) et SG ont une faible activité. Après 45 min d'incubation, les cerveaux HFD ont une activité des

calpains 3 fois plus importante que celle trouvée dans les 2 autres groupes. Le GSSE ramène l'activité des calpains dans les cerveaux HG (HFD+GSSE) aux valeurs du groupe SD.

2.7.Effet du GSSE sur l'acétylcholinestérase

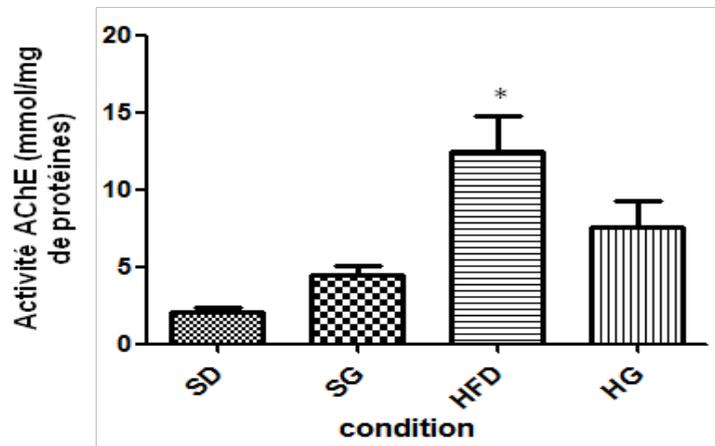


Figure 43 : Effet du GSSE sur l'activité AChE

*GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs HFD: * p<0.05*

2.8.Effet du GSSE sur la superoxyde dismutase (SOD)

Nous avons opté pour la mesure de l'activité de la SOD totale au niveau du cerveau afin de voir l'effet du traitement au HFD puis au GSSE sur les cerveaux.

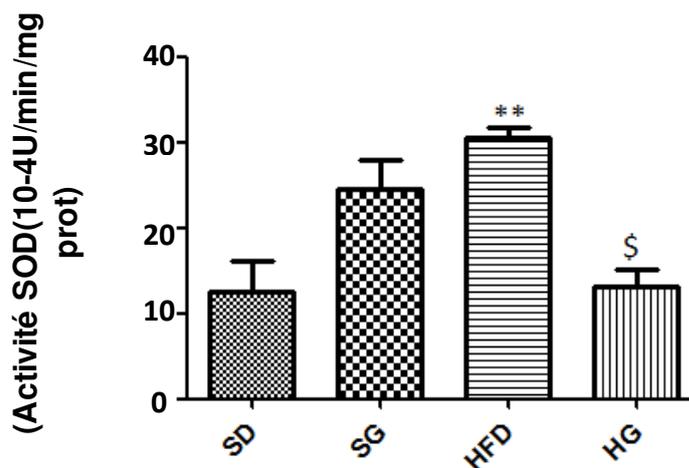


Figure 44: Effet du GSSE sur l'activité SOD cérébrale

GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM

(n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs HFD: ** $p < 0.001$, SD vs SG : $\$ < 0.05$

Les résultats obtenus montrent qu'après un traitement riche en gras (HFD) et en absence de GSSE, l'activité de la SOD double et elle est significativement plus élevée par rapport au contrôle. Le traitement au GSSE ramène ces taux élevés à des valeurs proches des cerveaux de rats contrôle SD.

2.9.Effet du GSSE sur la catalase

L'effet du HFD sur l'activité catalase est illustré sur la figure 45. L'analyse des résultats montre que l'activité de cette enzyme enregistre une augmentation significative exclusivement au niveau des cerveaux des rats recevant un régime alimentaire riche en graisse.

Le GSSE ramène l'activité catalase des rats obèses à des valeurs comparables au SD.

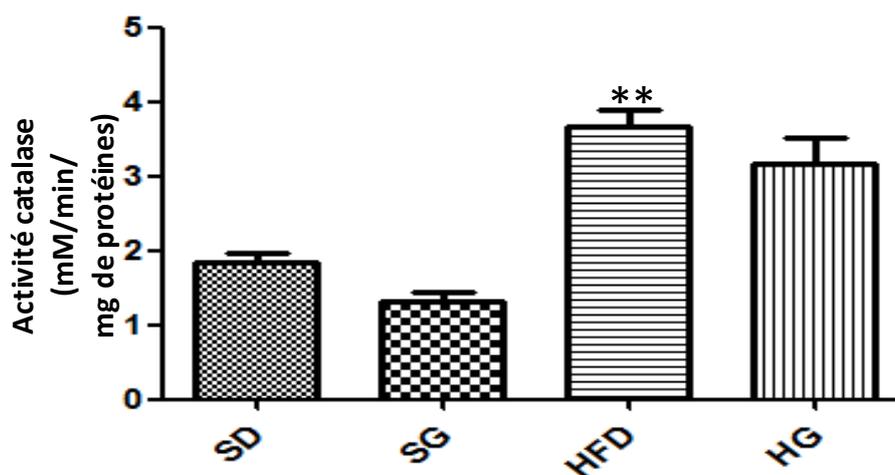


Figure 45: Effet du GSSE sur l'activité catalase cérébrale

GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs HFD: * $p < 0.05$, HFD vs HG : $\$ < 0.05$

3. Effet du HFD et du GSSE sur les médiateurs de la transduction des signaux

3.1.Calcium cérébral

L'effet du HFD sur la concentration cérébrale du calcium est illustré par la figure 46 qui montre une augmentation significative du calcium dans le cerveau des rats obèses par rapport aux témoins.

Le traitement au GSSE corrige la déplétion du taux de calcium cérébral et le ramène à des valeurs proches du témoin (SD).

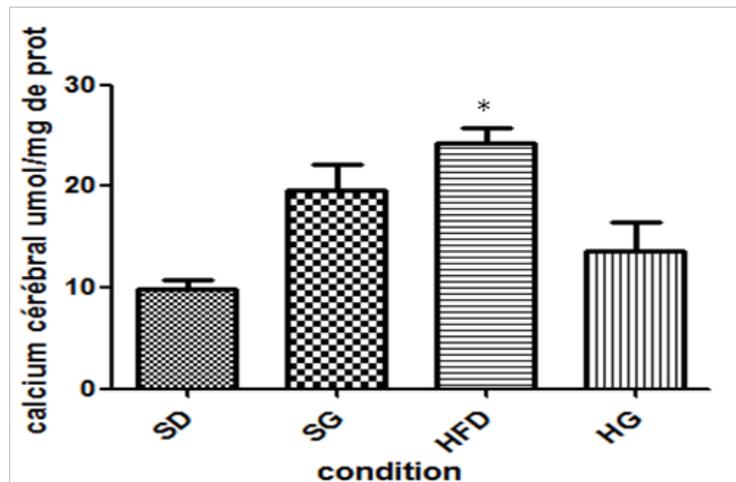


Figure 46 : Effet du GSSE sur le taux de calcium cérébral

*GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs HFD: * $p < 0.05$*

3.2.Lactate cérébral

L'effet du HFD sur la concentration cérébrale du lactate est illustré par la figure 47 qui montre qu'un traitement riche en graisse (HFD) engendre une augmentation très significative du taux de lactate dans le cerveau et qu'un co-traitement au GSSE corrige significativement cette augmentation et restaure le taux du lactate au niveau de celui des cerveaux de rats témoins (SD).

Il est à signaler que chez les rats recevant un régime standard, un traitement au GSSE entraîne une accumulation moins significative du lactate dans les cerveaux contrairement à son effet chez rats obèses.

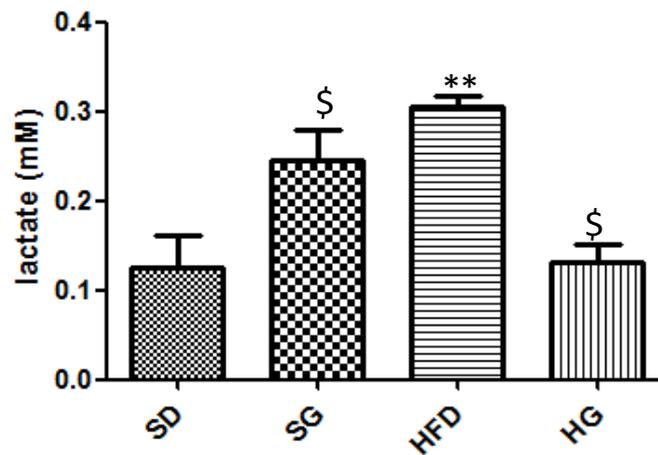


Figure 47 : Effet du GSSE sur le taux de lactate cérébral

*GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs HFD: ** $p < 0.001$, \$ $p < 0.05$.*

3.3. Peroxyde d'hydrogène cérébral

Le HFD augmente de façon significative le niveau de H_2O_2 cérébral. Le traitement au GSSE diminue significativement le niveau de H_2O_2 cérébral des rats soumis au régime SD et annule l'effet du HFD sur le H_2O_2 cérébral.

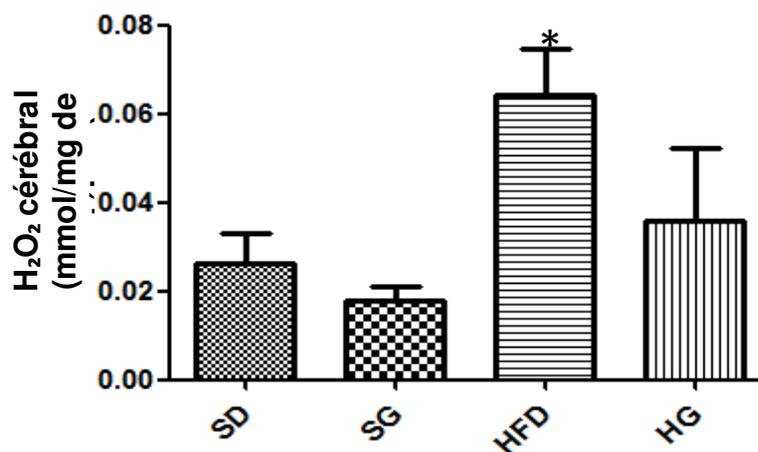


Figure 48: Effet du GSSE sur le taux du H_2O_2 cérébral

*GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs HFD: * $p < 0.05$.*

Partie 2 : Etude protéomique

1. De la préparation d'échantillons à l'analyse protéomique quantitative

1.1. Analyse différentielle du protéome total des cerveaux de rats traités

1.1.1. Extraction des protéines à partir des cerveaux et dosage

Trois réplicats de chaque condition biologique (SD, SD+GSSE, HFD, HFD+GSSE) ont été utilisés pour l'extraction des protéines solubles avec le tampon D2R2 (Urée 7M (Acros), Thiourée 2M (Acros), DTT 65 mM (Acros), CHAPS 4% (Acros), TRIS HCL 0,04 % (ACROS) additionné de 100µl d'inhibiteurs de protéases (Roche)) après une étape de délipidation, à partir des cerveaux de rats dans les différentes conditions de traitement. La quantité de protéines totales est dosée par la méthode de Bradford afin de pouvoir mener l'électrophorèse sur gel avec 150µg de protéines totales par gel.

Les résultats du dosage des 4 extraits protéiques sont représentés dans le tableau suivant (moyenne des trois réplicats biologiques de chaque condition) :

Echantillons	[protéines totales] mg/ml
SD	15.78
SD+GSSE	18.96
HFD	9.5
HFD+GSSE	16.27

1.1.2. Séparation sur gel monodimensionnel

Afin d'avoir une idée préliminaire sur le contenu protéique des cerveaux des rats traités dans les différentes conditions, on a eu recours à l'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE. Après normalisation des volumes prélevés de chaque échantillon par rapport à leurs concentrations protéiques, on ajuste les volumes avec du tampon d'échantillon. Une optimisation des conditions de migration sur gel a été élaborée et nous a permis d'utiliser un gel d'acrylamide à 14% sur lequel on a déposé une quantité de 150µg de protéines.

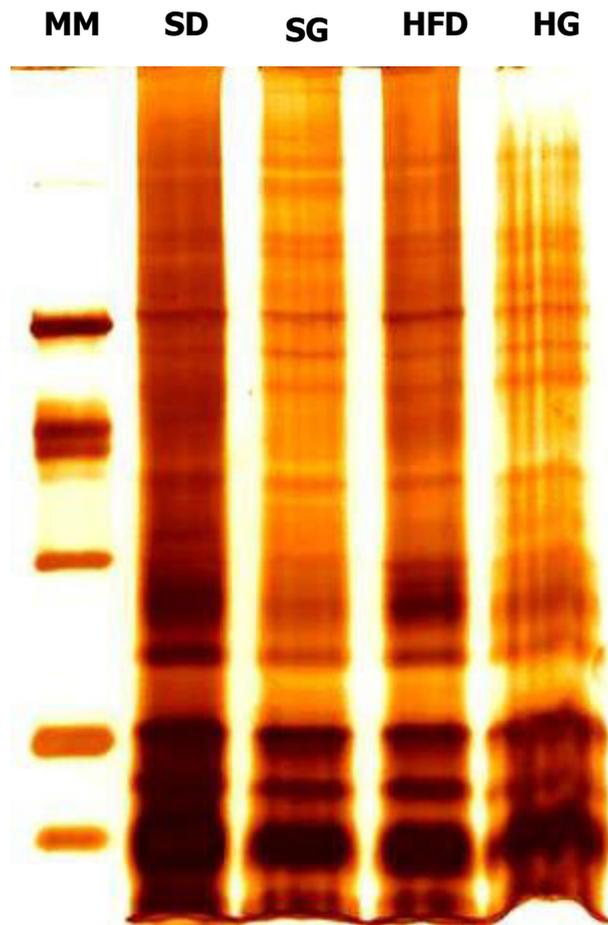


Figure 49: Gel SDS-PAGE d'extraits protéiques de cerveaux coloré au nitrate d'argent

*MM : marqueur moléculaire ; SD : standard diet ; SG : SD+GSSE ; HFD : High fat diet ;
HG : HFD+GSSE ; GSSE : Grape seed and skin extract.*

Sur la figure 49, le gel 1D ne présente pas de différences significatives entre les extraits protéiques de cerveaux dans les 4 conditions. Cependant, le trop grand nombre de bandes protéiques pourrait masquer des différences entre les échantillons déposés sur gel.

1.1.3. Séparation par électrophorèse bidimensionnelle

Le grand nombre de bandes protéiques observées sur le gel 1D pourrait masquer des différences entre les échantillons correspondant aux différentes conditions de traitement déposés sur gel. Nous avons alors eu recours aux gels bidimensionnels. Les conditions électrophorétiques sont détaillées dans la partie 'matériel et méthodes'. De plus, dans la mesure où les migrations ont été effectuées en parallèle et à partir de la même méthode d'extraction des protéines des cerveaux de rats, une comparaison des profils protéiques dans les 4 conditions de traitement a été élaborée (Figure 50).

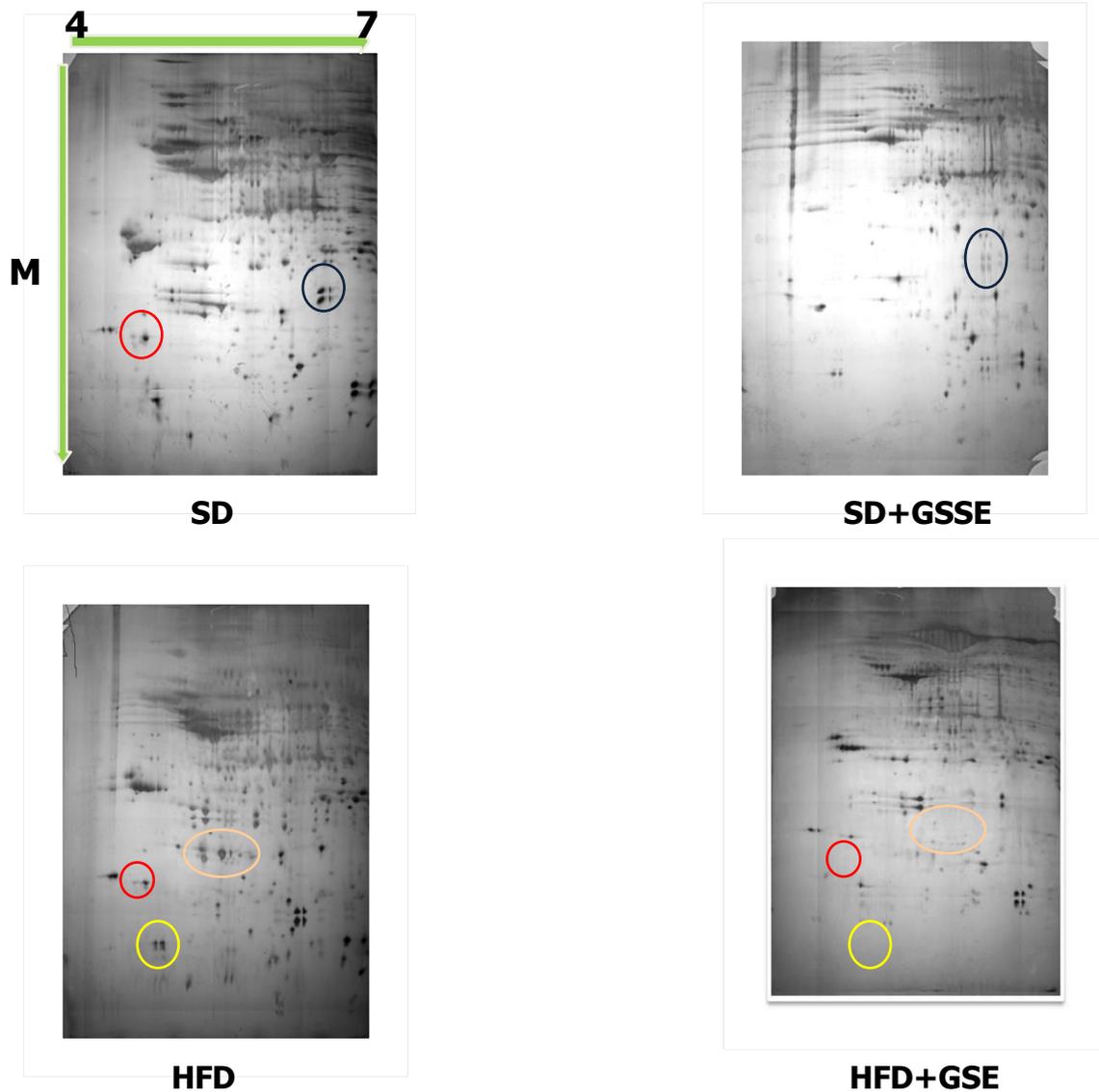


Figure 50: Cartes 2-DE des échantillons de cerveaux dans les 4 conditions avec un gradient de pH 4-7.

Ainsi, une mise au point a été effectuée en vue d'optimiser les paramètres de la 2D. La première étape de la mise au point était le choix du gradient de pH dans lequel se réalise l'étape de focalisation des protéines. Avec un gradient de pH compris entre 3 et 10, de nombreuses protéines des cerveaux n'ont pas été bien séparées du côté acide des gels. C'est pourquoi nous avons restreint la gamme de séparation du gradient de pH, en utilisant des bandelettes de pH 4-7. Il faut noter la présence d'un spot très abondant en haut du gel, qui perturbait la migration dans cette région. Celui-ci correspondrait à une protéine particulièrement abondante dans les cellules eucaryotes.

Afin d'améliorer la qualité des cartes protéomiques, les échantillons étaient traités après l'étape de lyse cellulaire avec le kit *2-D clean Up* (figure 51). Cette fois, les résultats

étaient très encourageants à plusieurs niveaux. En premier lieu, lors de l'étape d'IEF, la montée en tension s'effectuait normalement, ce qui témoignait de la réduction de la quantité de composés interférents lors de ce traitement. De plus, les cartes protéomiques présentaient une meilleure focalisation des spots protéiques ainsi qu'une forte diminution des traînées horizontales observées précédemment.

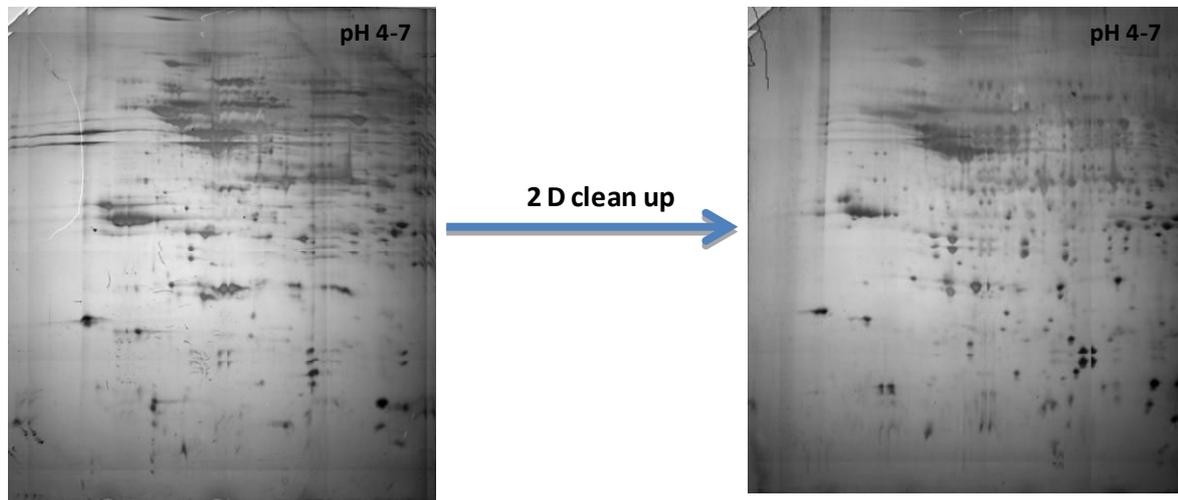


Figure 51: Cartes 2-DE du même échantillon traité ou non avec le kit 2-D clean Up.

Malgré ces résultats probants, la phase d'optimisation de l'2-DE a été longue. Il s'est révélé difficile de réaliser des cartes protéomiques interprétables avec les échantillons traités au gras HFD. En effet, il était difficile d'obtenir des gels reproductibles, permettant de réaliser une analyse comparative entre les échantillons de cerveaux de rats traités dans les 4 conditions.

De plus, il semblait difficile d'étudier l'ensemble des protéines en une seule analyse. Suivant la gamme de pH choisie, un certain nombre de protéines n'était pas bien focalisées et ne pouvait être comparées entre les groupes de rats. La difficulté à obtenir des gels semblables pouvait provenir du nombre important d'étapes sensibles à des biais dans une analyse par 2-DE. Ainsi, pour obtenir des cartes protéiques fiables, il s'est avéré nécessaire de faire migrer au maximum deux bandelettes en même temps lors de la première dimension.

En outre, le manque de reproductibilité au sein d'un même groupe de rats réduisait fortement les capacités de l'analyse différentielle. Cette différence pouvait provenir de l'étape d'extraction des protéines à partir des cerveaux de rats. En effet, les échantillons pouvaient être plus moins contaminés par les sels et les lipides, ce qui influençait la migration des protéines et la qualité des cartes protéiques obtenues.

A l'issue de ces travaux, la 2-DE ne nous a pas semblé être la technique la plus adaptée pour identifier de potentielles différences apportées aux protéomes des rats suite aux différents traitements effectués dans notre étude.

1.2. Analyse MALDI des échantillons de cerveaux de rats dans les différentes conditions de traitement

Face aux difficultés des méthodes d'analyse classiques, les approches d'analyse protéomique par spectrométrie de masse présentent un intérêt certain. En effet, elles ne sont pas limitées par la taille et la composition de banques de données protéiques et peuvent identifier non seulement des cibles connues mais aussi de nouveaux candidats cliniques. Les avantages analytiques inhérents à la spectrométrie de masse (MALDI TOF) incluent sa sensibilité, sa résolution, sa vitesse et son débit d'analyse, combinés aux méthodes poussées d'interprétation des données grâce aux outils bioinformatiques. Cette approche permet l'identification rapide et systématique de centaines de protéines candidats. Au-delà de la simple identification, les stratégies mises au point doivent offrir la possibilité de comparer des échantillons et de proposer des éléments discriminants. Par exemple, l'analyse comparative du protéome de rats obèses présentant des complications différentes (diabète, cancer...) peut produire une information sur les modifications induites par la maladie directement au niveau protéique ainsi son implication dans le processus de l'obésité. La procédure permettant de découvrir de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou des cibles thérapeutiques suit un cheminement long et complexe allant de la collecte et la préparation d'échantillons prélevés sur des rats, à la validation des résultats, en passant par l'analyse protéomique différentielle permettant de proposer des biomarqueurs potentiels. Le défi reste qu'à chaque étape, de nombreux éléments peuvent affecter la reproductibilité et des biais peuvent influencer sur le résultat final.

Nous avons choisi d'appliquer cette approche à l'identification de nouveaux marqueurs au niveau du cerveau de rats dans le cas de l'obésité ainsi que l'effet du GSSE sur ces protéines touchées par le gras. Dans ce contexte, une large part du travail a d'abord consisté en la mise au point de conditions et d'outils expérimentaux pour une analyse ciblée et la plus complète possible des protéines spécifiques mal régulés de l'obésité. Récemment, le concept de profils peptidiques et/ou protéiques cérébraux chez les rats dans les différentes conditions de traitement a été proposé. Cette notion propose la détection de plusieurs marqueurs pour identifier l'effet du gras ainsi que celui apporté par le GSSE de manière spécifique avec fiabilité. Dans ce contexte, l'analyse directe des tissus cérébraux par MALDI répond parfaitement à ces critères.

Nos études ont été plus particulièrement focalisées sur les différences de présence des peptides ou protéines des cerveaux dans les différentes conditions de traitement, dont le but est de détecter par études différentielles ces biomarqueurs potentiels dans les tissus à l'aide des outils statistiques. Par la suite, après caractérisation, ces biomarqueurs pourront être validés par d'autres approches comme l'approche western blot plus quantitative utilisant des anticorps spécifiques et la biologie moléculaire.

Plusieurs difficultés pour ce type de projet sont à souligner. Ces difficultés résident dans les différences entre les tissus en contenu peptidique/protéique liés à la variabilité entre les rats. Comme pour toute approche protéomique, il existe la variabilité intra-rat. Afin d'assurer une bonne reproductibilité de l'analyse protéomique, un même cerveau a subi des répétitions techniques au MALDI. Une autre difficulté réside dans la variabilité inter-rat. Cette modification est beaucoup plus difficile à contrôler et nécessite un grand nombre d'échantillons pour être palliée. Dans cette étude, tous les rats sont du même sexe muni d'un même élevage et étant traités dans les mêmes conditions pendant les 8 semaines.

De plus, pour l'analyse des résultats du MALDI, nous n'avons considéré que les marqueurs protéiques absents/présents entre les cerveaux SD/HFD et ceux des HFD/HFD+GSSE.

1.2.1. Analyse MALDI des protéines et des peptides digérés à partir des cerveaux de rats

L'analyse des protéines extraites à partir des cerveaux de rats traités dans les différentes conditions montre des différences très peu remarquables sur les profils des spectres MALDI TOF. La figure 52 montre qu'il y a des différences entre les conditions expérimentales. Des pics sont présents aussi bien chez les cerveaux des rats HFD que ceux traités au GSSE (HFD+GSSE) tels que le pic m/z 8200 et le pic m/z 11790. Cependant, le pic correspondant à m/z 4969 n'est pas détecté chez les cerveaux de rats non traités (SD) mais présent chez les rats traités au gras (HFD). Le traitement au GSSE corrige cette augmentation d'où la disparition de m/z 4969 dans les échantillons de cerveaux de rats traités HFD+GSSE. Plusieurs autres pics correspondant à d'autres protéines présentes dans les différents échantillons sont détectés. Il est à signaler qu'on ne tiendra compte que des pics correspondants aux ions absents/présents dans les différentes conditions de traitement. De ce fait, il existe dans les différents échantillons plusieurs pics dont l'intensité est modulée d'une condition à une autre.

En observant certaines régions du spectre de la figure 52, force est de constater que les pics correspondant aux protéines identifiées ne sont pas bien séparées ce qui explique la zone de la gamme considérée entre 4000 et 8000 sur les spectres protéiques MALDI. Ainsi l'extraction peptidique se présente comme une étape primordiale à l'obtention de spectres de qualité

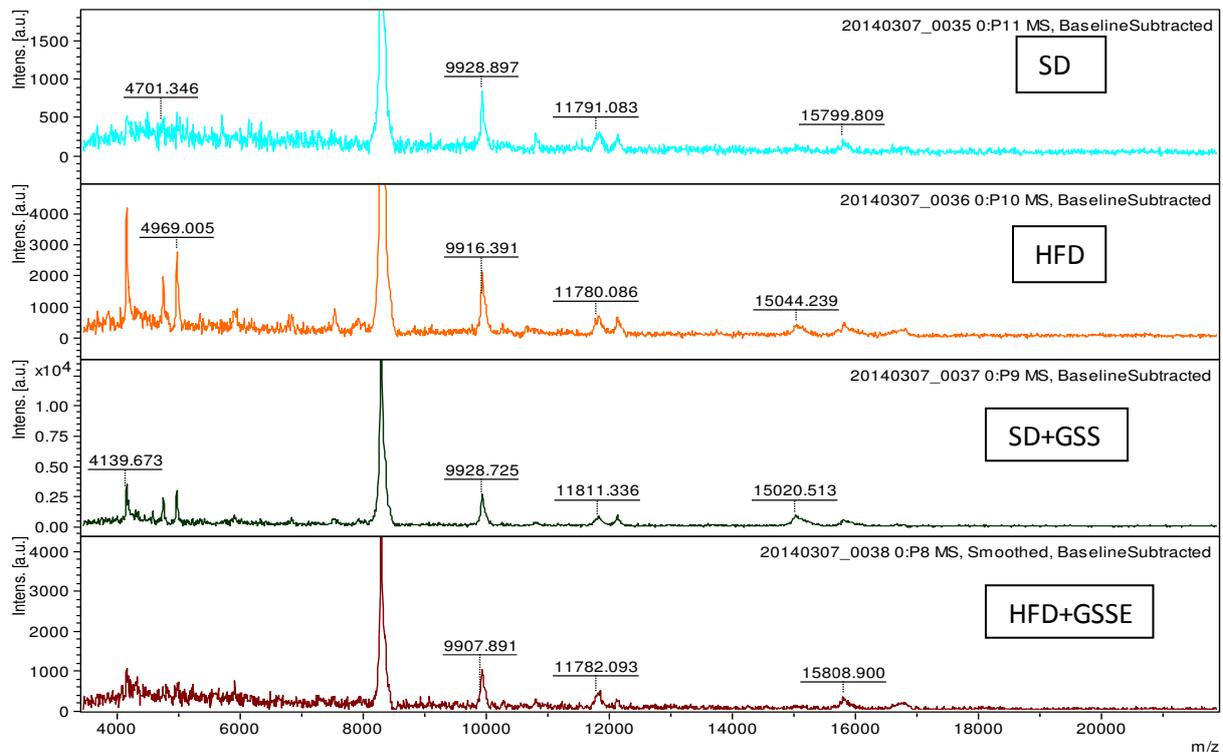


Figure 52: Spectres de masse MALDI TOF obtenus à partir de cerveaux de rats SD (a), HFD (b), SD+GSSE (c), HFD+GSSE (d) enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice HCCA.

Par la suite, une digestion trypsique en solution a été entreprise et une différence de profil peptidique a été relevée après analyse MALDI TOF des différents digests. En effet des peptides (m/z 2798.507, m/z 3183, m/z 3598) n'apparaissent pas dans les fractions SD+GSSE et HFD+GSSE mais sont présents dans les fractions SD et HFD (figure 53).

L'analyse des cerveaux dans les 4 conditions de traitements (SD, HFD, HFD+GSSE, SD+GSSE) révèle des profils peptidiques différents. La figure 53 présente un exemple de profils types obtenus sur ces échantillons. Comme le montre la figure 53, les ions présents dans les deux spectres sont relativement différents, mettant en évidence une modification du contenu peptidique des cerveaux dans le cas de rats traités au gras (HFD) par rapport à ceux recevant un régime normal (SD). De même pour les cerveaux de rats obèses traités au GSSE dont le contenu peptidique est différent de celui des rats HFD. Il est à signaler que tous les

ions ont été retenus sur les spectres MALDI TOF aussi bien les pics absents/présents dans l'une des conditions que les pics qui ont subi une modulation d'intensité. On ne tiendra compte pour l'interprétation des résultats que de l'effet du gras (qui revient à comparer les profils SD vs HFD) et l'effet du GSSE sur la lipotoxicité cérébrale qui est montré par la comparaison des profils peptidiques HFD vs HFD+GSSE.

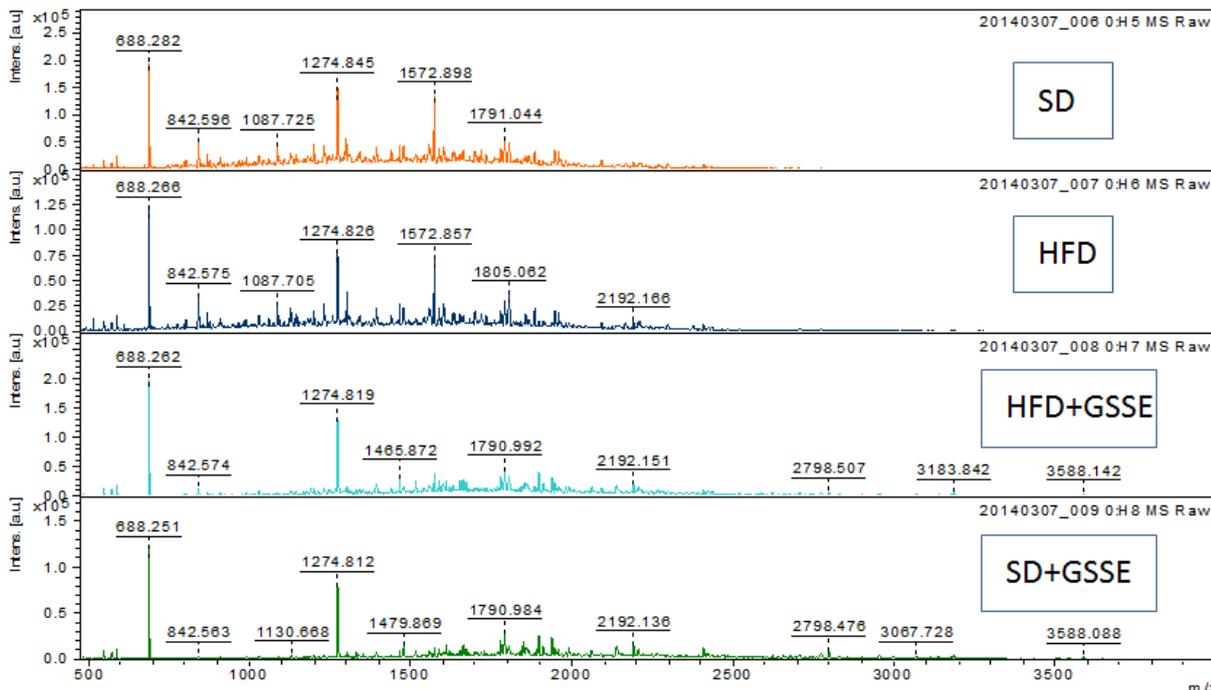


Figure 53: Spectres de masse obtenus à partir d'échantillons de cerveaux de rats (a)SD, (b)HFD, (c)HFD+GSSE, (d)SD+GSSE obtenus après digestion trypsique et enregistrés en mode linéaire réflecteur positif après dépôt de la matrice HCCA.

Les analyses sur les extraits peptidiques après lavage à l'acétonitrile acidifié ont permis de retrouver le fragment de m/z 1572 dans les échantillons de rats SD et HFD alors qu'il n'a pas été détecté dans aucun des spectres de cerveaux de rats traités au GSSE (HFD+GSSE et SD+GSSE). Grâce à cette approche, le fragment de m/z1572 a été détecté ainsi que d'autres peptides et protéines de petite taille.

1.2.2. Conclusion

L'analyse protéomique différentielle par MS s'appuie sur la comparaison du contenu protéique de plusieurs extraits cérébraux issus de rats obèses (HFD) et traités au GSSE (HFD+GSSE) ou de rats suivant un régime standard (SD). Cette approche a permis de mettre en évidence des protéines ou des fragments de protéines exprimés spécifiquement par le traitement au gras ou au GSSE par rapport au SD. Ces différences de profils protéiques et

peptidiques sont bien en concordance avec les résultats des gels 1D ou bidimensionnelle qui ont été entrepris précédemment. Parmi celles-ci on trouve le fragment 4969 après une analyse protéique MALDI ou le fragment 1572 après une digestion trypsique du produit protéique ainsi que d'autres protéines.

Les résultats qualitatifs préliminaires de ces analyses comparatives entre les protéomes cérébraux dans les différentes conditions de traitement étant encourageants, nous nous sommes orientés vers l'étude quantitative des protéines différenciées dans les cerveaux de rats traités ou non au gras (HFD) et au GSSE.

Pour ce faire, nous avons opté pour d'autres techniques complémentaires basées sur la spectrométrie de masse haute résolution tel que LTQ-orbitrap qui a l'avantage de l'identification ainsi que la quantification d'un grand nombre de protéines d'un mélange complexe.

1.3. Analyse différentielle par l'approche protéomique quantitative (Label-Free)

Les études de protéomiques différentielles utilisant la quantification sans marquage (Label-free) sont basés sur la quantification MS1 (aires des pics d'élution chromatographique des peptides) ou sur le nombre de spectres MS/MS acquis pour chaque protéine (Griffin, Yu et al ; 2009). Cette technique présente plusieurs avantages : son faible coût puisqu'elle ne nécessite pas de marquage et sa gamme dynamique importante puisqu'elle permet l'identification et la quantification des protéines d'un échantillon complexe. Cependant, la technique de quantification sans marquage présente aussi un inconvénient majeur. En effet les analyses des différents échantillons à comparer se faisant successivement, il est possible de trouver une variation de temps de rétention pour un même peptide. Cela impliquera alors, au cas où la disparité se révèle très importante, l'utilisation d'un outil de réaligement des analyses effectuées avant toute reconstitution de profils peptidiques. Cette lacune en terme de traitement bioinformatique est également retrouvée dans la technique avec marquage : en effet malgré que les échantillons peuvent être mélangés plus ou moins tôt dans l'extrait biologique, il est tout de même nécessaire de repérer les peptides appariés (forme isotopiquement légère et alourdie par exemple). Il est donc clair que chacune des techniques (avec ou sans marquage) a ses limites, c'est pour cela qu'il n'y a pas de consensus pour le choix de la technique à suivre pour aborder un projet d'étude.

Pour chacune des conditions de traitement (SD, SD+GSSE, HFD, HFD+GSSE) et afin de diminuer les variations d'intensité ionique dues à des différences de configuration du système

chromatographique, on a passé les échantillons de façon successive afin d'avoir des temps de rétention les plus reproductibles. On appelle extraction ionique le processus de détermination des volumes des pics peptidiques et le pic d'éluion est appelé EIC ou XIC (Extracted Ion Chromatogram). Pour chaque m/z, un XIC lui est attribué dans chaque expérience nano-LC MS/MS et les volumes des pics résultant peuvent être comparés de façon quantitative entre les différents échantillons. Pour ce faire deux logiciels ont été utilisés :

- Proteome Discover : un logiciel qui permet l'identification des protéines dans les différents échantillons
- Progenesis : commercialisé par Nonlinear dynamics qui a été utilisé principalement pour l'analyse 2-DE différentielle. Recemment il a été utilisé comme la méthode de choix pour la quantification des protéines à partir des expériences nano LC-MS. Ce logiciel permet d'analyser les données en 3 étapes : traitement des données brutes avant la génération des valeurs d'aires des pics peptidiques (pre-processing), intégration (génération des valeurs de XIC) et analyse statistique.

Dans notre étude nous avons opté pour une comparaison des profils protéiques entre les 4 conditions commençant par l'étude de l'effet du traitement riche en graisse sur les protéines des cerveaux de rats (SD vs HFD) puis voir leur correction par le GSSE (HFD vs HFD+GSSE) afin d'élaborer une analyse différentielle entre les 3 conditions (SD, HFD, HFD+GSSE) et de montrer l'effet protecteur du GSSE contre la lipotoxicité cérébrale à partir des profils protéiques obtenus par l'analyse 'label-free'.

1.3.1. Quantification relative à l'aide de Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics)

Pour chacune des conditions de traitement (SD, HFD, SD+GSSE et HFD+GSSE), et pour limiter les variations d'intensité ionique dues à des différences de configuration du système chromatographique, nous avons passé les échantillons successivement afin d'obtenir des temps de rétention les plus reproductibles possibles. Le processus de détermination des volumes des pics peptidiques est appelé extraction peptidique et le pic d'éluion est appelé EIC ou XIC (EXtracted Ion Chromatogram). Ce XIC peut être produit pour chaque m/z de chaque expérience nanoLC-MS/MS et les volumes des pics résultants peuvent être comparés de façon quantitative entre les différents échantillons. Pour notre approche Label-free utilisée on a choisi le logiciel Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Upon-Tyne, UK).

a) Pre-Processing des données

Les 36 «.wiff» (4 conditions de traitement* 3réplicats biologiques*3réplicats techniques) sont importés directement dans Progenesis. Chaque « data file » est représenté par un diagramme à deux dimensions (RT en abscisses et m/z en ordonnées). Le « run » de référence a été sélectionné automatiquement et tous les autres « runs » ont été alignés à celui-ci. L'étape d'alignement est très rapide (environ deux heures) (figure 54). Progenesis indique, en %, la valeur de score d'alignement de chaque « run » par rapport à celui de référence (figure 55). On considère que l'alignement est bon à partir d'une valeur de 60%. Une zone verte sur la carte peptidique (figure 56) correspond à un bon alignement, auquel cas il n'est pas nécessaire de l'examiner manuellement (figure 56).

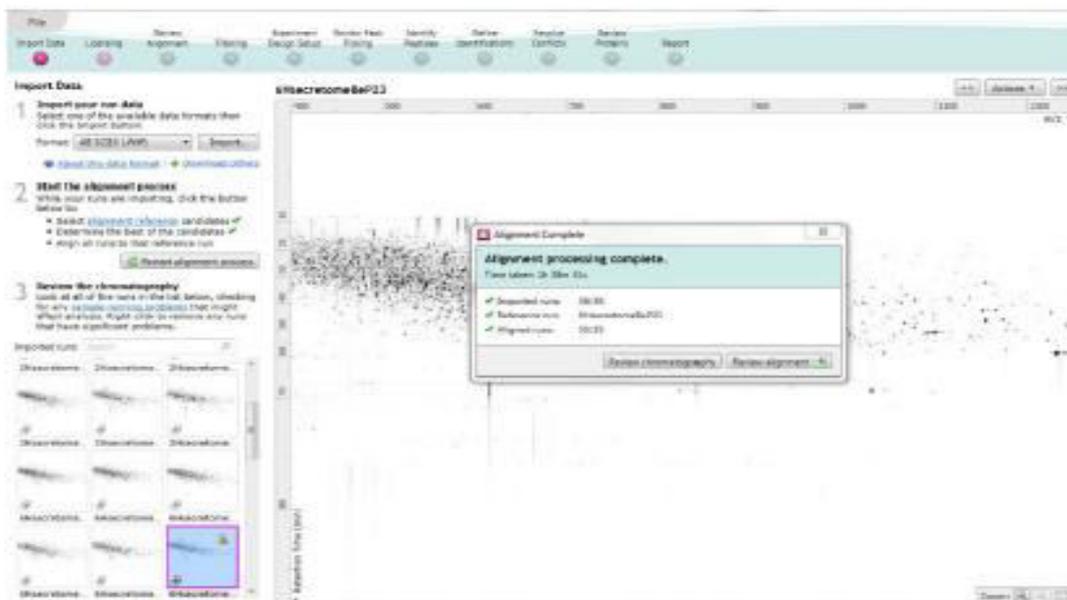


Figure 54: Durée d'alignement des 36 « runs »

Run	Include?	Vectors	Score
Cerveau H2a	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	524	86,9%
Cerveau H3a	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	422	85,4%
Cerveau H4b	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	275	72,5%
Cerveau S1a	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	310	75,0%
Cerveau S2a	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	471	84,9%
Cerveau S3a	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	505	85,8%
Cerveau S4b	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ref	
Cerveau HG4a	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	565	93,4%
Cerveau HG2a	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	658	86,2%

Figure 55 :Table d'alignement des vecteurs et scores de quelques « runs »

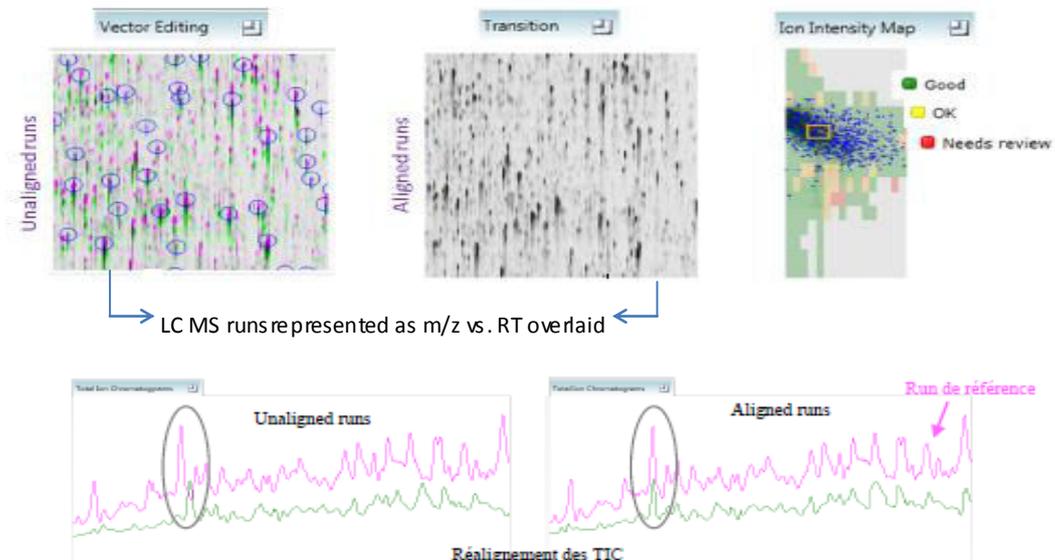


Figure 56: Réalignement des cartes 2-D massiques

Pour la détection des peptides, des paramètres de « pic peaking » peuvent être fixés (charge maximale et temps de rétention). Dans notre cas nous avons changé la charge maximale des peptides qu'on a limitée à 8. Après leur détection, les peptides sont filtrés en laissant que ceux qui sont 2 à 8 fois chargés. Une normalisation automatique est ensuite appliquée sur tous les peptides de chaque « run ».

Pour l'identification, les spectres MS/MS de notre sélection sont exportées sous forme d'un sous fichier «.mgf» et identifiés à l'aide du moteur de recherche Mascot. Une fois la recherche finalisée, les résultats Mascot sont exportés sous forme de fichier «.xml» et importés au sein de Progenesis. Toute identification ayant un score inférieur à 15 a été éliminée.

b) Calcul des valeurs d'aires des pics peptidiques

La quantification par Progenesis a été faite à partir des peptides protéotypiques de chaque protéine identifiée. Progenesis extrait le XIC de chaque peptide et utilise la moyenne normalisée des abondances de chaque peptide par condition. Les volumes de pics résultants peuvent être comparés de façon quantitative entre les différentes conditions. Les résultats peuvent être visualisés sous la forme 1D, 2D ou 3D (figure 57).

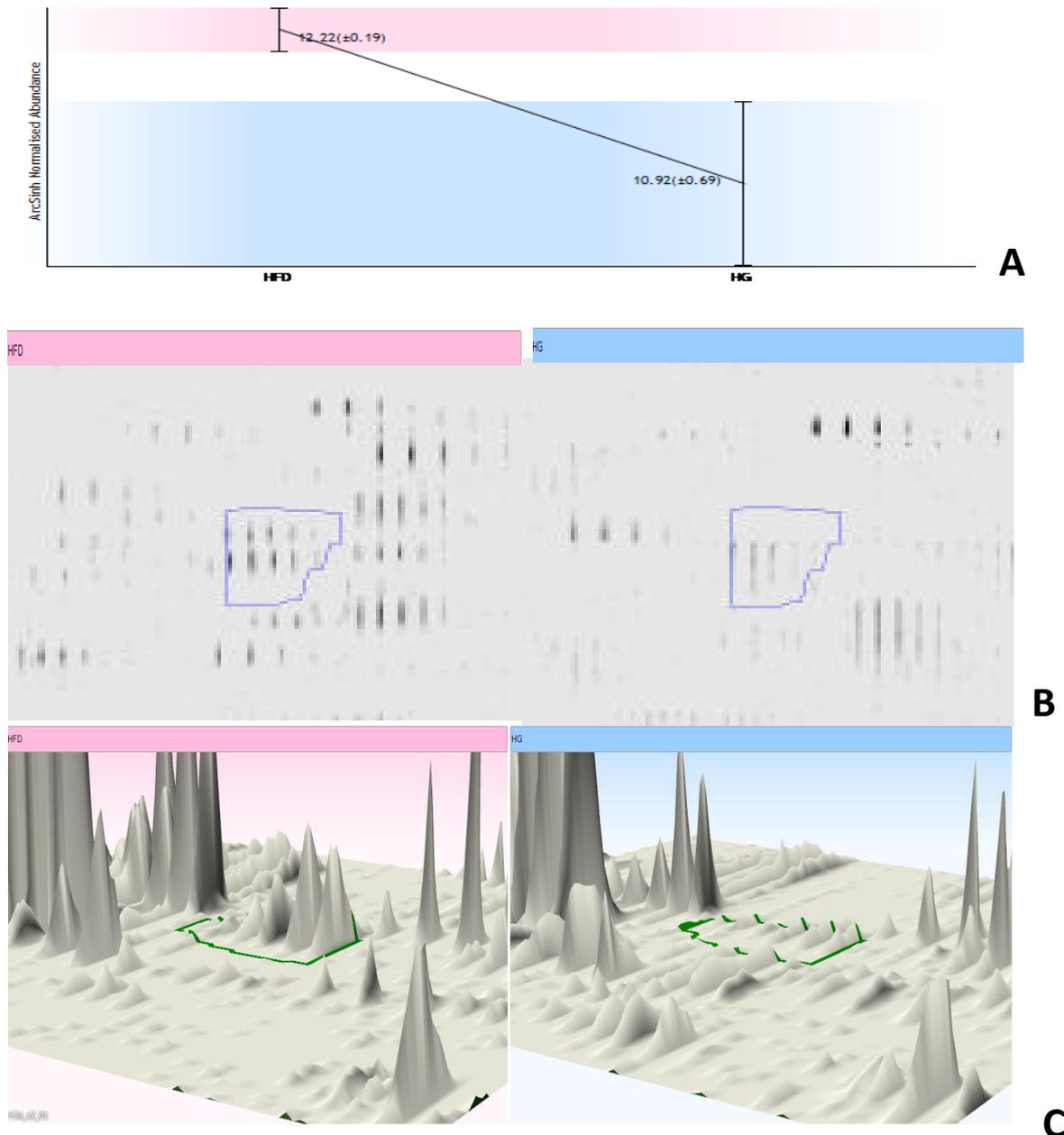


Figure 57: Représentation schématique du XIC. (A) :1D, (B) :2D et (C) :3D

c) Analyse statistique

A la différence des autres logiciels qui traitent statistiquement les données par le T-test afin de comparer deux groupes indépendents, Progenesis utilise l'ANOVA test (Analysis of Variance) qui permet de comparer les moyennes de plusieurs groupes indépendants et de représenter les résultats sous forme de profil d'expression (figure 58). Toutes les protéines que nous avons sélectionnées ont une p-value ≤ 0.05 . Progenesis est capable de créer des dendogrammes pour illustrer le regroupement des protéines différentiellement exprimées entre les groupes. Il est aussi capable de réaliser une PCA (Principal Components

Analysis) sur les données pour la mise en évidence de similitudes et de différences entre les différentes conditions étudiées (figure 58).

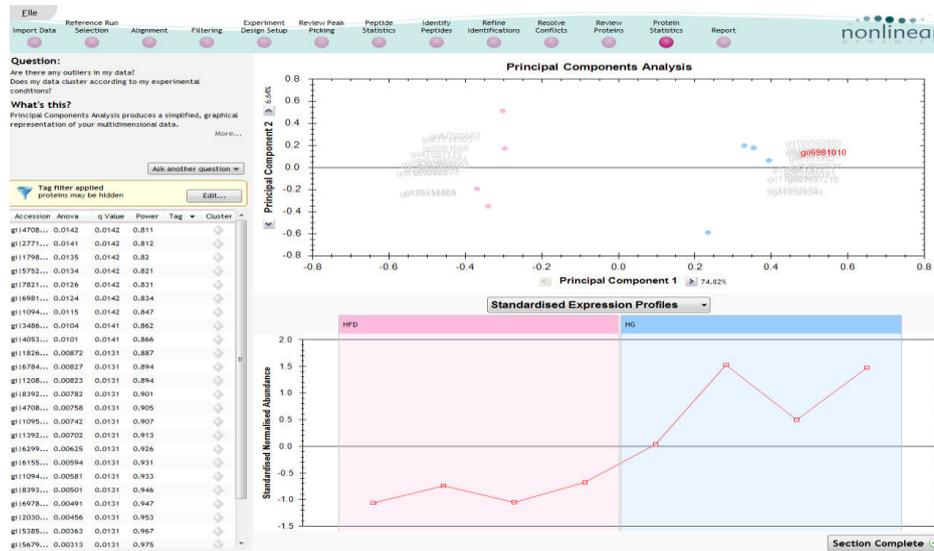


Figure 58 : illustration des protéines regroupées sous forme d'une PCA

Après avoir identifié et quantifié les protéines différenciées entre les différentes conditions de traitement, plusieurs outils informatiques ont été utilisés afin d'analyser les voies métaboliques présentes dans l'ensemble des données. Les voies métaboliques les plus importantes qui ont été touchées aussi bien par le traitement HFD que par le traitement au GSSE sont représentées dans le tableau 10.

Canonical pathways	$-\log(\text{p-value})^a$	Ratio ^b (overlap)	Proteins
Exp 1. Pathways promoted in HFD			
Mitochondrial dysfunction	3,89	0,0224 (3/134)	HSD17B10,ATP5B,VDAC1
Calcium transport I	2,15	0,111 (1/9)	ATP2B2
Exp 1. Pathways promoted in SD			
p70S6K signaling	3,64	0,0275 (3/109)	YWHAQ,GNAI2,PPP2R1A
Mitochondrial dysfunction	3,37	0,0224 (3/134)	NDUFA10,VDAC3,VDAC1,UQCRC1,VDAC2
HIPPO signaling	2,55	0,0286 (2/70)	YWHAQ,PPP2R1A
PI3K/AKT signaling	2,22	0,0192 (2/104)	YWHAQ,PPP2R1A
Exp 2. Pathways promoted in HFD			
Mitochondrial dysfunction	11,90	0,097 (13/134)	HSD17B10,ATP5C1,PRDX3,ATP5H,PRDX5,ATP5A1,UQCRC2,NDUFS2,NDUFA10,VDAC3,VDAC1,UQCRC1,VDAC2
HIPPO signaling	8,01	0,114 (8/70)	PPP2R1A,YWHAQ,YWHAH,PPP2CA,PPP2R2A,YWHAB,YWHAZ,PPP1CB
PI3K/AKT signaling	6,65	0,0769 (8/104)	PPP2R1A,YWHAQ,MAPK1,YWHAH,PPP2CA,PPP2R2A,YWHAB,YWHAZ
p70S6K signaling	6,49	0,0734 (8/109)	PPP2R1A,YWHAQ,MAPK1,YWHAH,PPP2CA,PPP2R2A,YWHAB,YWHAZ
Gluconeogenesis I	5,42	0,222 (4/18)	ENO2,ALDOA,GAPDH,MDH1
Exp2. Pathways promoted in HG			
GA BA receptor signaling	7,68	0,133 (8/60)	DNM1,SLC6A11,NSF,SLC32A1,AP2M1,SLC6A1,AP1B1,GABRA1
Calcium transport I	4,41	0,333 (3/9)	ATP2B1,ATP2B4,ATP2B2
Clathrin-mediated endocytosis signaling	3,65	0,0452 (7/155)	DNM1,AP2M1,AMPH,CLTC,AP1B1,SNAP91,PPP3CA
Lipid antigen presentation by CD1	3,60	0,188 (3/16)	AP2M1,CANX,AP1B1
Calcium signaling	3,09	0,0432 (6/139)	MYH10,ATP2B1,SLC8A2,PPP3CA,ATP2B4,ATP2B2
Tight junction signaling	2,40	0,0379 (5/132)	NSF,MYH10,CLDN11,SPTAN1,CTNNA1

^aThe significance values for the canonical pathways is calculated by Fisher's exact test right-tailed.

^bThe ratio corresponds to the number of genes in a given pathway divided by the total number of genes that make up that pathway.

Tableau 12: Représentation des voies canoniques les plus importantes présentes dans les différents ensembles de données.

1.3.2. Effet du traitement riche en graisse (HFD) sur le profil protéique des cerveaux de rats

Les échantillons protéiques des cerveaux de 3 rats SD et 3 rats HFD ont été analysés par LTQ-Orbitrap et en moyenne 167 protéines dont 38 avec au moins 2 peptides ont été identifiées par échantillon. Un réplicat technique a été réalisé pour chaque échantillon.

Afin d'évaluer la reproductibilité des expériences, des diagrammes de Venn ont été réalisés entre les échantillons de cerveaux de rats SD d'un côté et HFD d'un autre côté (Figure 59). En effet, 797 protéines identifiées sont communes aux échantillons de cerveaux de rats contrôles (SD) et 758 protéines communes aux échantillons de cerveaux de rats traités au gras (HFD). Quelques dizaines de protéines se sont révélées uniques à chaque échantillon. On est bien donc devant des échantillons reproductibles entre eux.

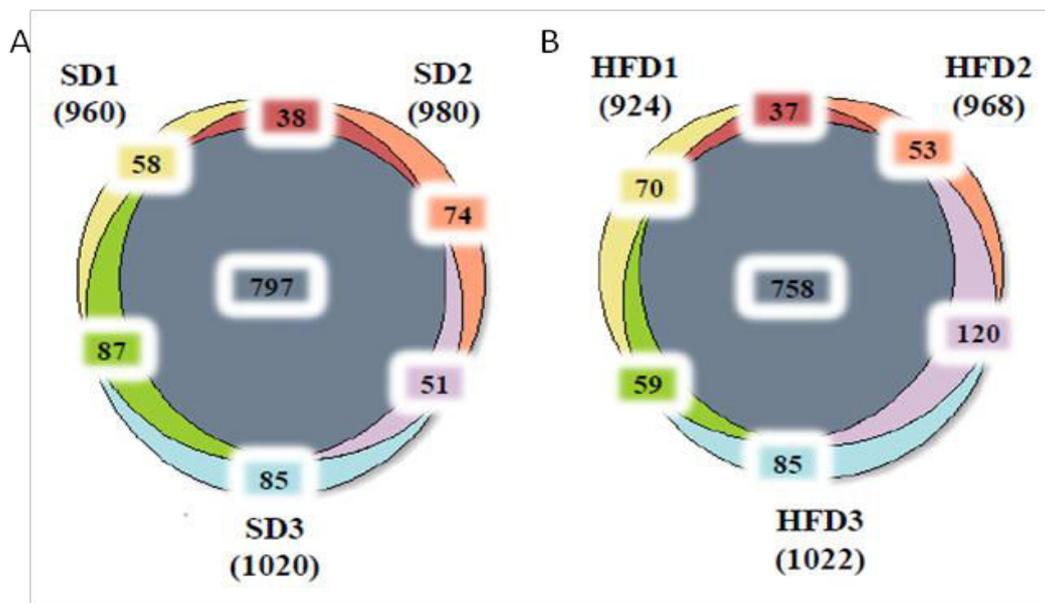


Figure 59: Diagrammes de Venn de toutes les protéines identifiées dans les cerveaux de rats SD (A) et HFD (B)

L'analyse différentielle du protéome des échantillons de cerveaux de rats SD (non traités) et HFD a permis de mettre en évidence et d'identifier **92 peptides** différentiellement exprimés (p -value et q -value < 0,05 ; Puissance > 0,8) correspondant à **15 protéines surexprimées et 22 sous exprimées** chez les cerveaux de rats traités au gras (HFD) (tableau 11).

UniProt ID	Annotation	Description	# peptides ^a	Score ^b	Protein ANOVA(p-value)	SD/HFD ratio
Proteins accumulated in rat brain from animals exposed to HFD						
P06686	Atp1a2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	2	79	2.34E-02	0.52
P11506	Atp2b2	ATPase, Ca ²⁺ transporting, plasma membrane 2	3	170	3.55E-04	0.49
Q05175	Basp1	Brain abundant, membrane attached signal protein 1	2	89	1.24E-02	0.47
Q62717	Cadps	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion	2	104	1.98E-02	0.62
O88778	Bsn	Bassoon protein	2	103	1.25E-02	0.55
P48721	Hspa9	PREDICTED: similar to Stress-70 protein, mitochondrial precursor	2	80	2.80E-02	0.64
P64715	Map2	Microtubule-associated protein 2	7	331	3.41E-04	0.70
P31662	Slc6a17	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	2	105	4.19E-02	0.62
O70351	Hsd17b10	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	3	178	2.09E-02	0.73
Q9JK11	Rtn4	Reticulon 4	2	97	2.44E-03	0.73
P04764	Eno1	Enolase 1, alpha	3	208	4.84E-04	0.72

Q9Z2L0	Vdac 1	Voltage-dependent anion channel 1	2	142	6.46E-03	0.75
P13084	Npml	Nucleophosmin 1	2	84	6.17E-03	0.80
P10719	Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta subunit	2	111	3.44E-03	0.81
P07323	Eno2	Enolase 2, gamma	3	262	1.37E-02	0.86

Proteins accumulated in rat brain from animals exposed to SD

P60881	Snap25	Synaptosomal-associated protein 25	3	98	2.33E-02	1.18
P04797	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	73	4.34E-02	1.22
P53534	Pygb	PREDICTED: similar to Glycogen phosphorylase, brain form	2	83	1.77E-02	1.20
P00406	Mtco2	Cytochrome c oxidase subunit II	3	121	1.38E-02	1.33
Q66HA8	Hsph1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	2	93	2.65E-02	1.27
O70351	Opa1	RN protein	2	64	5.16E-03	1.32
Q64428	Hadha	Mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit	2	72	3.79E-02	1.47
Q5XIH3	Ndufv1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa	2	103	6.24E-03	1.34
Q5EEy3	Gnai2	Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2	2	86	9.31E-03	1.34
Q63092	Camkv	Vesicle-associated calmodulin-binding protein	2	76	2.80E-02	1.39

P68255	Ywhaq	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	2	124	6.37E-04	1.43
P35571	Gpd2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	2	80	5.79E-03	1.47
Q5XI34	Ppp2r1a	Alpha isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2	3	104	8.94E-03	1.51
P02680	Fgg	Fibrinogen, gamma polypeptide	2	71	9.98E-03	1.55
Q9Z1P2	Actn1	Actinin, alpha 1	3	118	6.56E-03	1.70
P06399	Fga	Fibrinogen, alpha polypeptide	2	126	7.99E-03	1.76
P02688	Mbp	Myelin basic protein isoform 1	4	184	2.48E-02	1.46
P60905	Dnajc5	Cysteine string protein	3	152	1.08E-04	1.71
M0RBL8	Tceal6	PREDICTED: similar to transcription elongation factor A (SII)-like 3	2	59	3.96E-02	1.91
Q63633	Slc12a5	Solute carrier family 12 member 5	2	118	9.22E-03	1.91
B1WC34	Prkesh	PREDICTED: similar to Glucosidase II beta subunit precursor	2	88	2.87E-02	2.30
Q6RKB3	Ncam2	Neural cell adhesion molecule 2	2	84	5.58E-03	2.16

Tableau 13: Identification des 37 protéines montrant une abondance différentielle entre les cerveaux de rats standard (SD) et les rats traités à la graisse (HFD).

^a Number of peptides that allowed protein quantitation.

^b Score from protein identification using Mascot

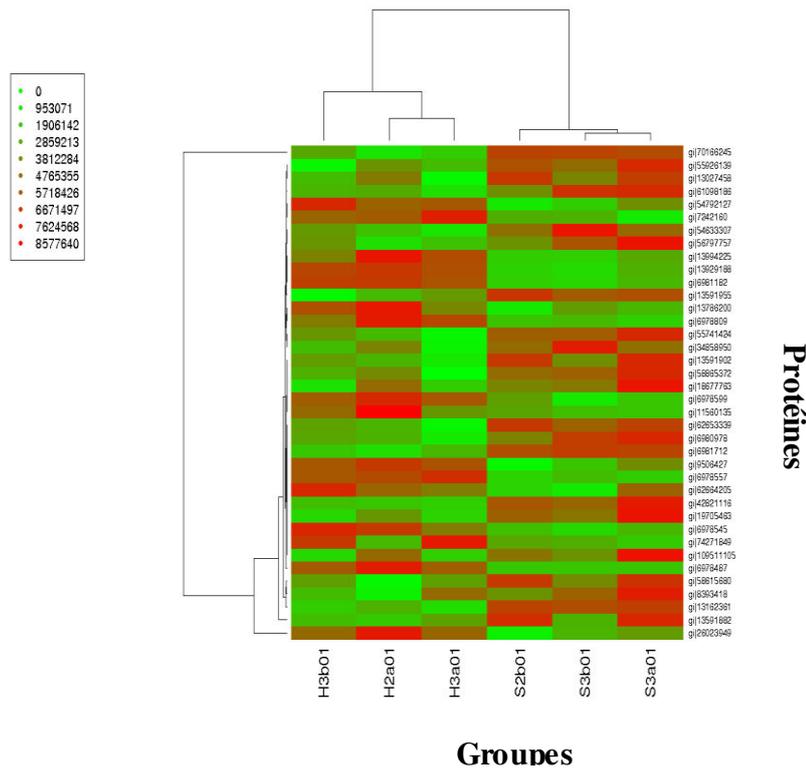


Figure 61: Clustering hiérarchique

Parmi les 37 protéines différenciées entre les cerveaux de rats SD et HFD, Eno1 et Eno 2 (les isoformes α et γ de l'énolase) ont été accumulées dans le groupe HFD. Une autre protéine (Map2 : microtubule associated protein 2) ayant le même profil et dont la quantification repose sur un grand nombre de peptides et une valeur $p < 0,001$ a été aussi identifiée. En revanche, YwhaQ (également connu sous le nom 14-3-3 theta protein et impliquée dans la régulation d'un large éventail de voies de signalisation) et Dnajc5 (une chaperonne impliquée dans la fonction neuronale) ont été sous exprimées dans les cerveaux de rat du lot HFD et ont été associées aux valeurs les plus significatives statistiquement (0,0006 et 0,0001, respectivement).

Ensuite une classification a été construite en utilisant les valeurs d'abondance relative (SD et HFD) extraites pour chacune des 37 protéines régulées (Figure 62).

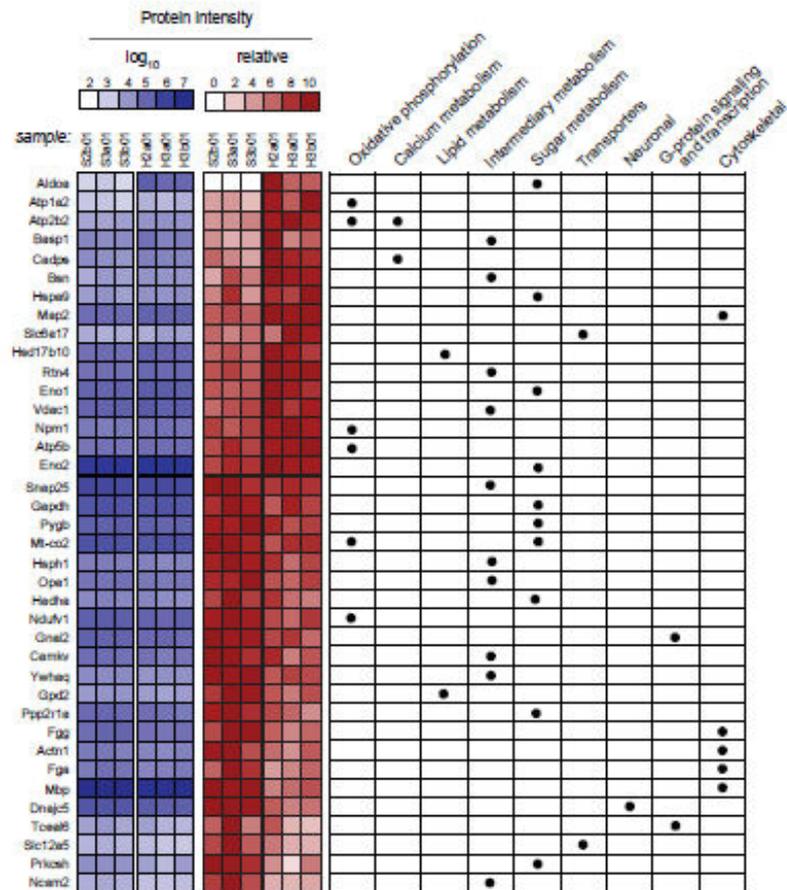
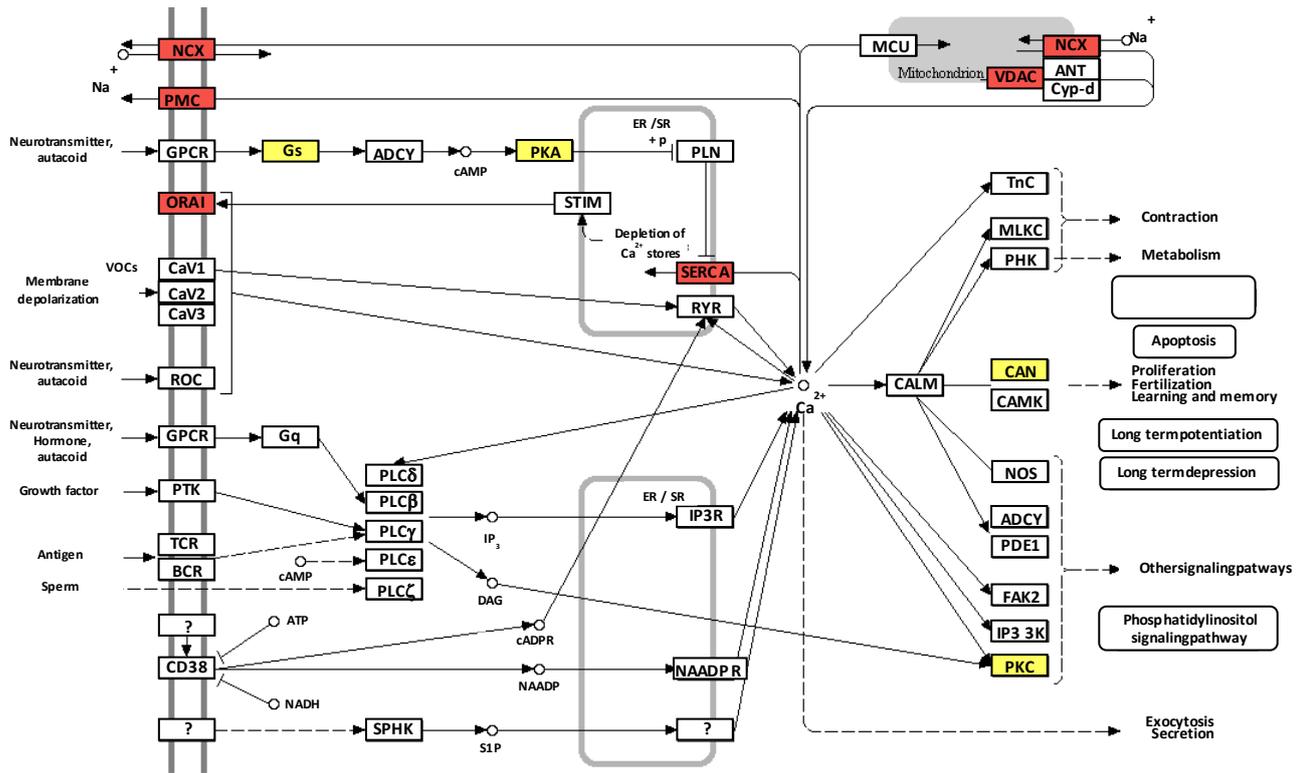


Figure 62 :« Heat map » montrant des protéines différentiellement régulées dans les échantillons de cerveau de rats SD et HFD.

Les lignes représentent les 37 protéines qui affichent des différences d'abondances statistiquement significatives avec les annotations fonctionnelles de chaque protéine. La carte montre des mesures d'intensités relatives entre chaque série de 3 conditions dans les deux conditions. L'ordre des protéines sur l'axe des Y a été réalisé selon la diminution des intensités moyennes dans les échantillons HFD.

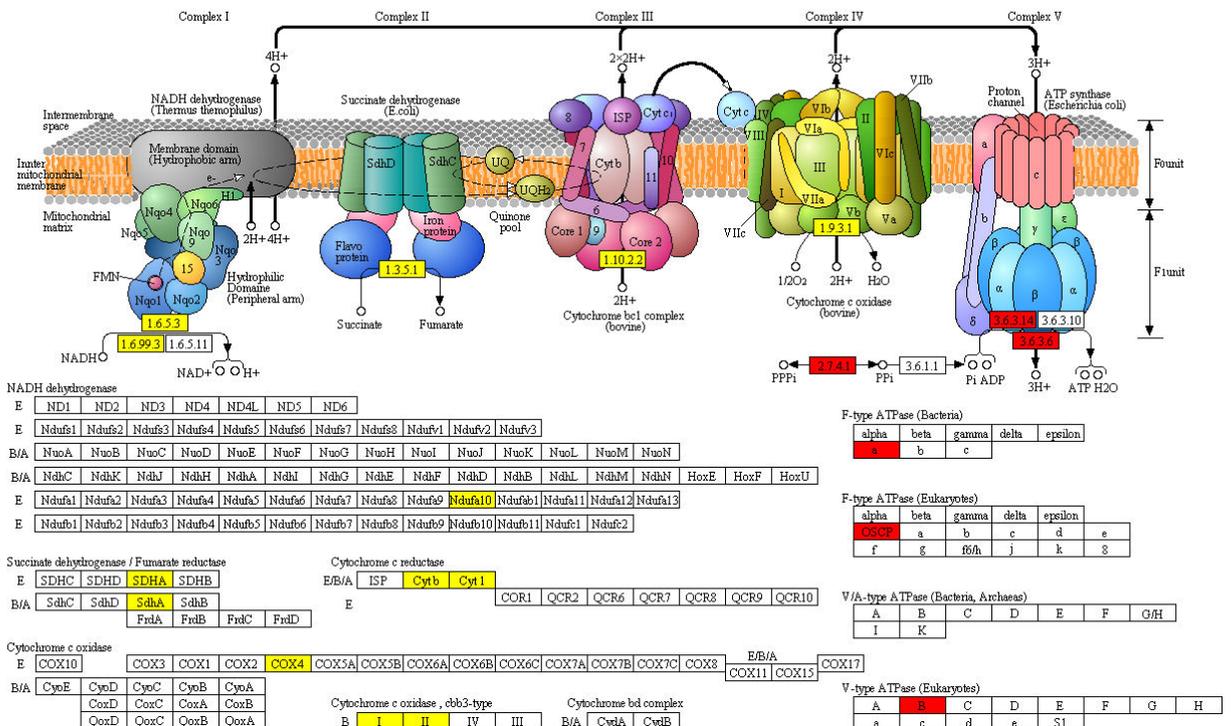
Tenant compte des différents processus biologiques impliquant ces protéines, 'Calcium homeostasis', 'oxidative phosphorylation (OXPHOS)' et 'Hypoxia inducible factor' (HIF) sont les processus les plus touchés par la lipotoxicité cérébrale comprenant des protéines surexprimées chez les cerveaux de rats traités au gras (HFD) (Figure 63A, B et C respectivement).

A



B

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION



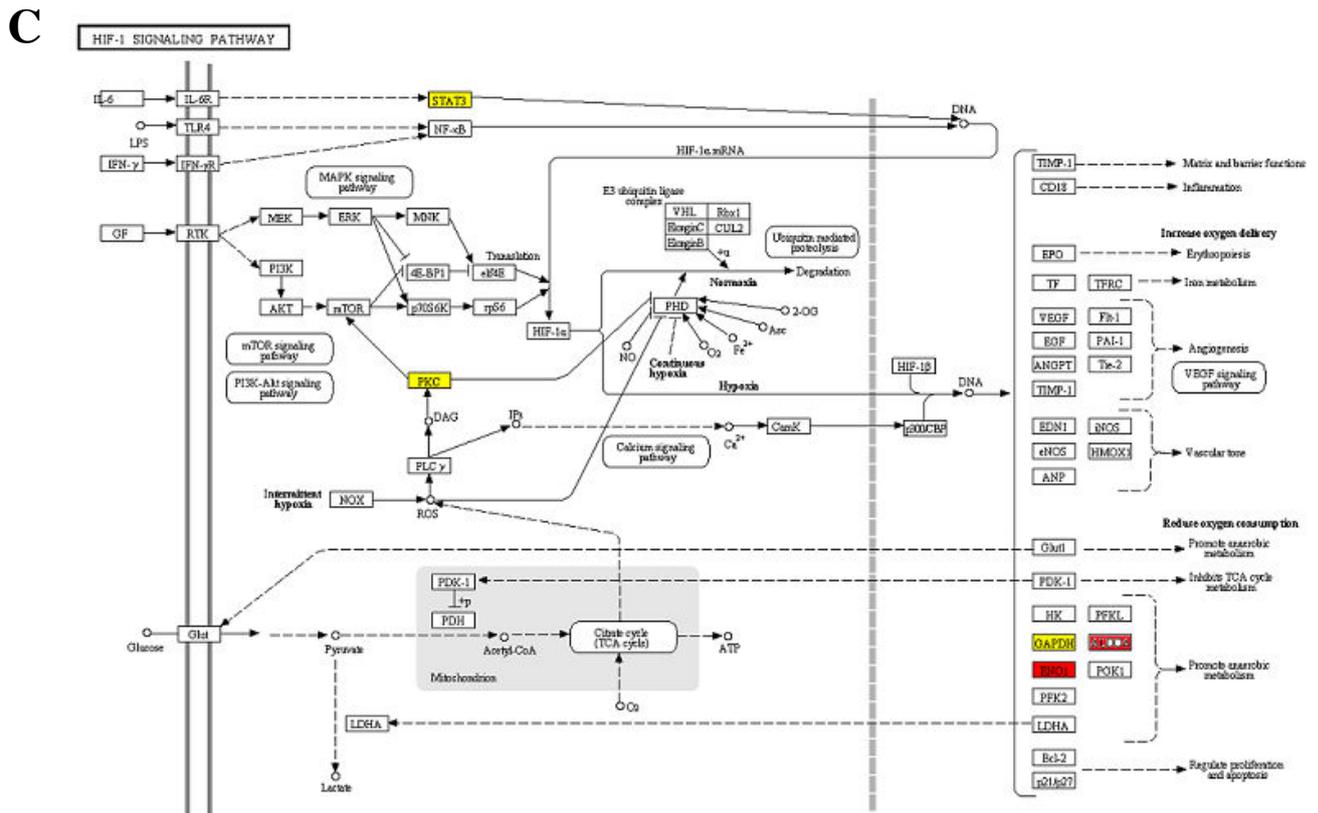


Figure 63: Modification des abondances relatives des protéines impliquées dans la signalisation du calcium (A), la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (B) et le HIF (C) après un traitement riche en lipides (HFD). Les protéines présentant une plus grande abondance en HFD sont en rouge et les protéines présentant un niveau inférieur en jaune.

Plusieurs protéines faisant partie du métabolisme énergétique mitochondrial (Atp1a2, Atp2b2, Ndufv1, Mtco2) présentaient une différence significative ($p < 0.05$) entre les valeurs des abondances relatives aux cerveaux de rats HFD par rapport aux tissus SD. Ces données ont mis en évidence, à la fois, une sur- et sous-expression des régulateurs clés de transfert d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons (ETC) ainsi que la production de l'ATP mitochondrial.

Nous avons aussi trouvé une différence d'expression de plusieurs protéines impliquées dans le processus de signalisation du calcium. En effet, les résultats révèlent que nombreuses sont les protéines impliquées dans le métabolisme du calcium (Vdac1, Atp2b2, Sl6a17, Atp1a2, Cadps) ainsi que dans le processus de liaison de la calmoduline (Atp2b2, Basp1, Map2). Toutes ces protéines étaient toujours régulées à la hausse dans les tissus cérébraux de rats traités au gras (HFD). Il est à signaler que des niveaux remarquables de quelques protéines (Gnai 2 et Ppp2r) ont été régulés à la baisse chez les rats HFD.

L'analyse d'autres voies fonctionnelles touchées par le régime gras (HFD) au niveau du cerveau a montré que plusieurs protéines associées au cytosquelette ont été sous-exprimées dans les cerveaux de rats HFD à savoir Fgg, Fga, Actn1 et Mbp alors que les protéines impliquées dans la glycolyse/néoglucogenèse étaient soit régulées à la hausse (Eno1 and Eno2) ou à la baisse (Gapdh, Gpd2) dans les cerveaux HFD. En outre, les acteurs du processus de signalisation HIF ont également été modulés en comparant les cerveaux des rats HFD vs SD. Fait intéressant, des études antérieures en oncologie ont montré que la voie HIF est surexprimée dans de nombreux types de cancers (Yang et al. 2014) et que dans des conditions de stress oxydatif, les niveaux HIF1 α et HIF2 α sont augmentés par rapport aux conditions normales. Le même travail a rapporté que HIF régule l'activité mitochondriale par modulation du cytochrome c oxydase (complexe IV de la chaîne de transport d'électrons) et l'activation de la transcription de la sous-unité VI-2 du cytochrome c oxydase (Yang et al. 2014). Ce dernier résultat est bien en concordance avec notre étude comparative des tissus de rats SD vs HFD. En effet, le traitement des rats au gras (HFD) inhibe le cytochrome c oxydase (Mt-co2) pouvant conduire à un stress oxydatif au niveau des tissus cérébraux.

1.3.3. Effet du GSSE sur le profil protéique des cerveaux de rats traités (HFD+GSSE) :

Les échantillons protéiques des cerveaux de 3 rats traités au gras (HFD) et 3 rats traités au GSSE ont été analysés par la même méthode LTQ-orbitrap et nous a permis d'identifier 456 protéines dont 329 ont été prises en considération avec au moins 2 peptides identifiés par échantillon. De même que l'analyse de SD vs HFD, une répétition technique a été réalisée pour chaque échantillon. Parmi ces protéines significativement différenciées entre les cerveaux de rats HFD et HFD+GSSE, existent les 37 protéines différenciées entre les cerveaux de rats SD et HFD. Parmi elles, 15 protéines ont été corrigées par le GSSE et 22 protéines ont été identifiées sans qu'elles soient corrigées par le GSSE.

L'analyse différentielle du protéome des échantillons de cerveaux de rats HFD (traités au gras) et HFD+GSSE (traités au gras et additionnés avec le GSSE) a permis de mettre en évidence et d'identifier 1399 peptides différenciellement exprimés (p -value et q -value $< 0,05$; Puissance $> 0,8$) correspondant à 182 protéines surexprimées et 145 sous exprimées chez les cerveaux de rats traités au gras et additionnés avec le GSSE (HFD+GSSE) (tableau annexe).

Cette combinaison de protéine a permis de scinder la population étudiée en deux groupes distincts lors de l'ACP, avec une composante principale de 85.28% (figure 64).

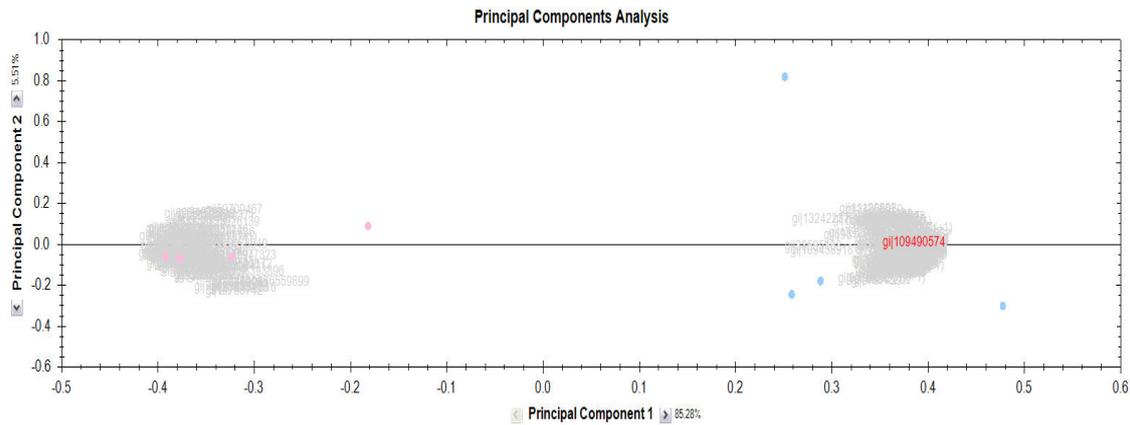


Figure 64 : Représentation de l'ACP des échantillons HFD (bleu) et HFD+GSSE (rose).

Dans le but de s'assurer de l'homogénéité des échantillons de cerveaux des différents groupes de rats, le meme outil bioinformatique a été utilisé. Le heat map obtenu après analyse des protéines significativement différenciées entre les deux lots decerveaux de rats HFD et HG (HFD+GSSE) et montrant l'effet du GSSE sur les protéines cérébrales est illustré dans la figure 65.

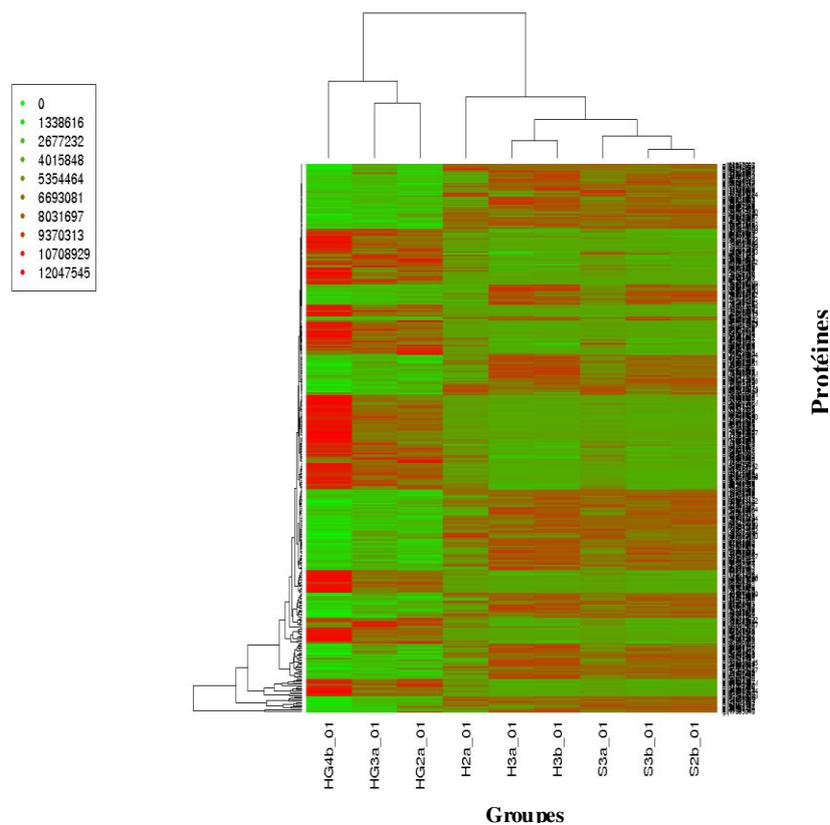


Figure 65 :Clustering hiérarchique des protéines différenciées entre les cerveaux de rats HFD et HG (HFD+GSSE).

L'exposition au GSSE présente une modification significative au niveau de la structure des protéines du tissu cérébral. En effet, 307 protéines ont été significativement ($p < 0.05$) modifiées au niveau des cerveaux de rats HG par rapport aux animaux HFD (figure 66). Sur ces 307 protéines, une étape de filtrage à été appliquée pour garder que les protéines présentant un 'fold change' >2 qui seront utilisées pour l'analyse des voies de signalisation. Les protéines restantes ont ensuite été traitées avec des outils bio-informatiques dédiés à mettre en évidence les voies métaboliques principalement modifiées.

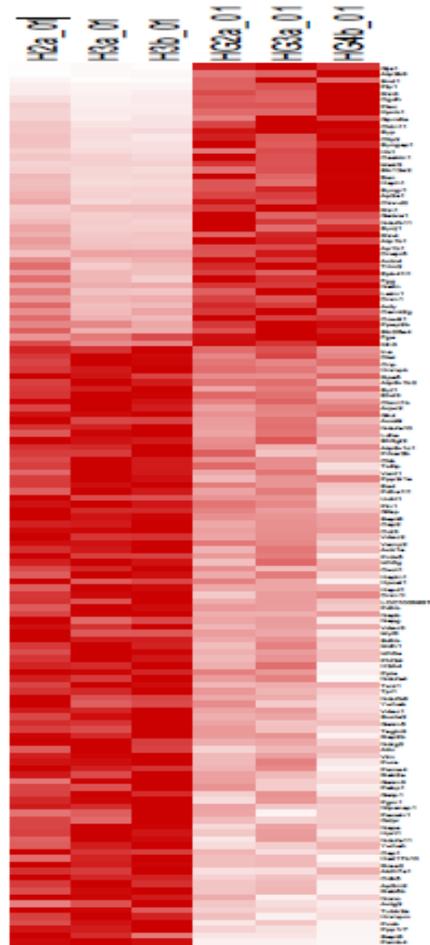


Figure 66:« Heat map » montrant des protéines différentiellement régulées dans les échantillons de cerveau de rats HFD et HG (HFD+GSSE).

Les voies métaboliques les plus significativement inhibées par le traitement au GSSE sont celles du 'HIF signaling', du 'calcium signaling', de la phosphorylation oxydative et du métabolisme de la glycolyse/la néoglucogenèse. Ces processus ont été tous régulés à la hausse après le traitement au HFD. De nombreux processus, n'étant pas affectés par le traitement au gras (HFD), sont induits par le traitement au GSSE. Parmi eux on retient le processus de

signalisation FOXO, de l'immunité de chimokine ainsi que celui de l'activation des plaquettes.

Nos résultats montrent que la moitié des protéines du processus de la phosphorylation oxydative, modifiées par le traitement au gras (HFD), ont été corrigées par le traitement au GSSE. En effet, l'expression de la succinate déshydrogénase (complexe II), du cytochrome b / c1 et du cytochrome c oxydase (complexe III et IV) ont été régulés à la hausse lors du traitement GSSE (Tableau 12). Cependant, le traitement des rats au GSSE induit d'autres protéines qui ne sont pas affectées par le traitement HFD tels que NADH déshydrogénase (ubiquinone), la protéine de Fe-S 2. Cette dernière protéine est une sous-unité de base de la membrane mitochondriale de la chaîne respiratoire NADH déshydrogénase (complexe I), qui catalyse l'oxydation du NADH avec une réduction concomitante de l'ubiquinone et l'exclusion des protons hors de la mitochondrie (Figure 67 A).

La voie de signalisation du calcium, régulée à la hausse dans les cerveaux de rats HFD, a été distinctement inhibée par le traitement au GSSE. On peut dire que, le calcium est la molécule de transduction du signal le plus répandu dans le corps comme il agit comme un important second messenger intracellulaire qui régule les processus vitaux dans presque toutes les cellules de mammifères. Le calcium est si important pour la fonction neuronale, que les cellules ont développé plusieurs mécanismes homéostatiques pour contrôler son niveau intracellulaire mais aussi sa localisation subcellulaire.

A partir de résultats obtenus par l'approche Label-free, on a remarqué que le traitement des rats avec le GSSE a pu corriger la majorité des protéines affectées par le gras (HFD). Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de l'homéostasie, y compris celui de l'influx de Ca^{2+} par l'intermédiaire des canaux voltage et canaux récepteurs (ROC), le mécanisme de tamponnage du calcium par la membrane plasmique et les protéines cytosoliques ainsi que le mécanisme de stockage du calcium dans les organites intracellulaires et enfin celui de l'efflux du calcium. Comme il a été préalablement mentionné, de nombreuses autres protéines non affectées par le traitement HFD, ont été induites lors d'une exposition GSSE, tels que les canaux calciques de type L (CAV1 et 2) qui jouent un rôle crucial dans la dépolarisation de la membrane ou le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3R) situé dans le réticulum sarcoplasmique/endoplasmique (RE / SR) impliqué dans la régulation de la libération de Ca^{2+} . Le 'calcium / calmodulin-dependent protein kinase' (CAM kinase) est un autre exemple des protéines nettement différenciées appartenant à la voie de signalisation de calcium qui

n'apparait pas lorsqu'on compare les cerveaux de rats HFD / SD, mais induite par le traitement au GSSE (Figure 67 B).

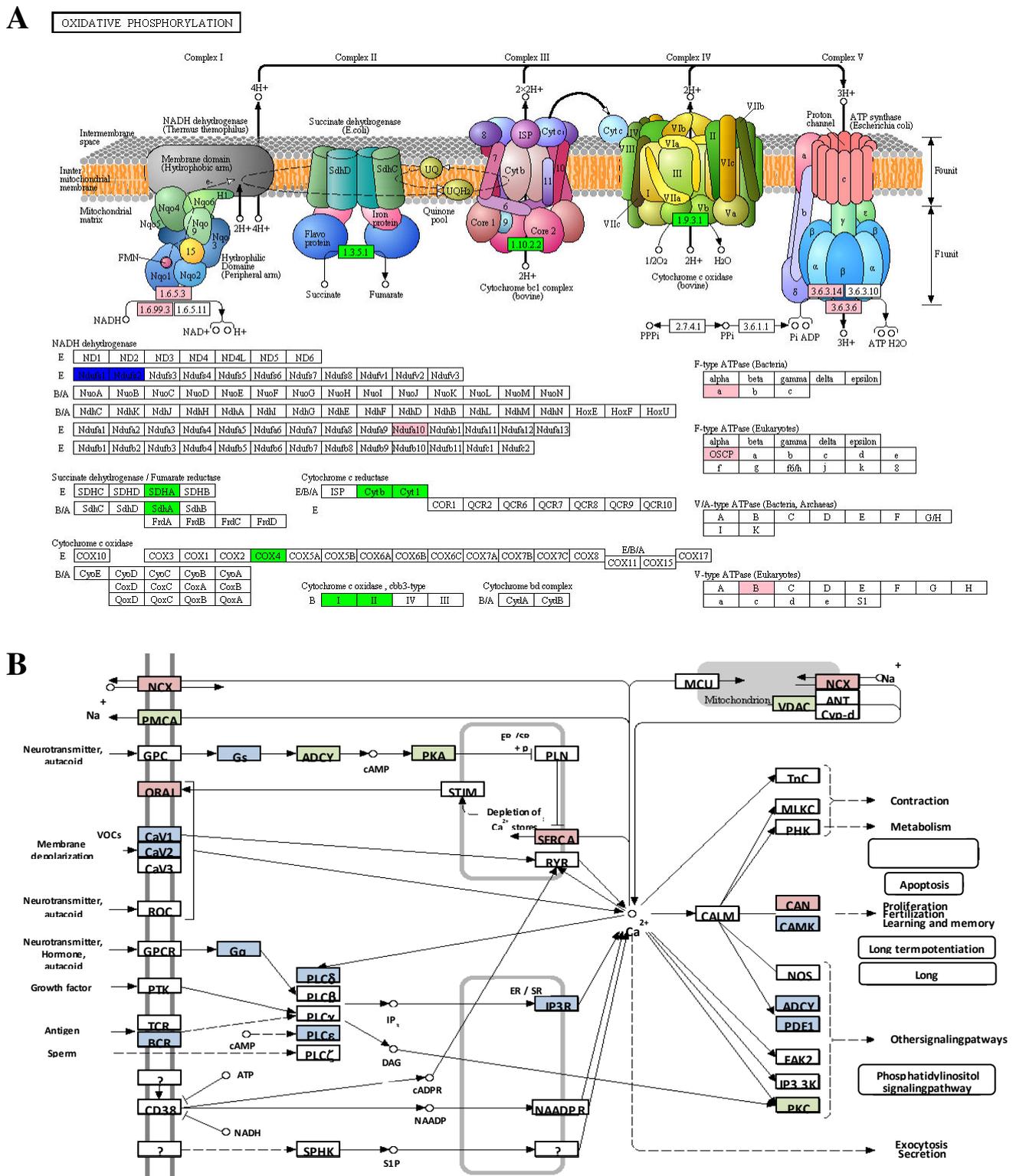


Figure 67 :Les corrections apportées par l'exposition au GSSE sur les animaux traités par la HFD: les protéines dont le niveau est corrigé par le GSSE sont en vert; les protéines en rose ne sont pas corrigées par le GSSE et les protéines en bleu clair sont de nouvelles protéines induites par le GSSE.

Lors de l'analyse de la voie glycolyse / néoglucogenèse, la modification de plusieurs enzymes clés (par la hausse ou la baisse) a été remarquée dans le cerveau des animaux traités au HFD, y compris ENO1, ENO2, Gapdh, Gapdh2 et Hspa9. Encore une fois, il est à noter que le traitement au gras (HFD) induit des modifications au niveau de la voie de la glycolyse/néoglucogenèse. Cette dernière a été corrigée lors du traitement au GSSE comme il a été le cas pour la voie de la phosphorylation oxydative (OXPHOS).

1.3.4. Bilan methodologique

Deux approches ont été testées pour identifier les protéines de cerveaux spécifiquement touchées par le traitement riche en graisse (HFD) ainsi que celles qui ont été corrigées par le co-traitement au GSSE. L'approche classique par 2-DE est la moins appropriée pour notre étude. Il semblait difficile d'obtenir des cartes protéiques interprétables. Or l'utilisation d'un logiciel de comparaison comme Progenesis Samespot nécessitait des images de gels d'excellente qualité et un nombre conséquent de réplicats. Il semblerait que le nombre important d'étapes soumis à des biais potentiels ont grandement influencé la nature des cartes protéiques obtenues.

De plus, pour obtenir des cartes protéomiques interprétables, il a été nécessaire de faire un choix de la gamme de pH dans laquelle s'effectuait la séparation des protéines, contrairement aux approches par spectrométrie de masse qui permettaient d'étudier l'ensemble du protéome. De plus, la 2-DE était moins adaptée pour une étude comparative de plus de 10 échantillons.

L'approche suivante se basait sur la spectrométrie de masse soit qualitative (sans quantification) à travers le MALDI ou avec une quantification sans marquage préalable, approche dite Label-free limitant les biais liés au marquage des échantillons. Il semblerait que cette dernière ait été la plus adaptée pour notre étude pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, l'électrophorèse bidimensionnelle consommait beaucoup plus d'échantillons, il nécessitait 150µg par échantillon pour un réplicat, contrairement à l'approche Label-free, étant très sensible, seulement 30µg par échantillon ont été utilisés avec seulement environ 1µg utilisé par réplicat.

Le faible nombre d'étapes lors d'une analyse par label free a permis de limiter au maximum les biais potentiels. En effet, avec l'approche 2-DE il était nécessaire de passer par plusieurs étapes au cours desquels des problèmes peuvent survenir.

A un autre niveau, malgré que l'utilisation de Progenesis LC-MS puisse apparaître intuitive, les analyses différentielles par des outils bioinformatiques semblaient particulièrement

adaptées et présentaient des avantages cruciaux pour nous orienter vers le choix de ce logiciel dans la suite de nos analyses. En effet, lors du traitement des données label free, une étape supplémentaire d'alignement des profils chromatographiques s'imposait, qui de plus était très consommatrice de temps. Elle permet de réduire grandement le risque d'erreur de sélection et d'intégration du « bon » XIC, surtout si d'autres signaux interfèrent avec le XIC du précurseur qui nous intéresse. Grâce à cet outil bioinformatique utilisé pour notre analyse différentielle, un test statistique a pu être réalisé. Ce test apparaît le plus adapté à notre design expérimental comportant 4 conditions de traitement différentes ainsi que des réplicats biologiques et techniques.

Le but de ces premiers travaux devait permettre de sélectionner la méthodologie la plus adaptée pour identifier de potentiels biomarqueurs protéiques prédictifs de la réponse à un traitement biologique. Ces travaux nous ont amenés à choisir la quantification par une approche label free, notamment par la possibilité d'étudier un grand nombre d'échantillons tout en limitant au maximum les possibles biais d'expérience. Pour les études à venir, il est important de valider de potentiels biomarqueurs par une méthode alternative, notamment de quantification absolue comme le Western blot.

Partie 3 : Validation des résultats par Western Blot

Dans le cadre de ma thèse, on a eu recours au western blot afin de confirmer les résultats précédents. Au cours de ces travaux, l'effet du traitement au gras et la protection au GSSE ont été bien montrés à travers l'analyse protéomique. Une première confirmation a été effectuée par mesure de quelques activités enzymatiques ainsi que quelques marqueurs de stress oxydatif au niveau du cerveau. Le western blot, étant une méthode de quantification absolue, nous a aussi permis de valider les résultats de la variation des protéines observées dans l'analyse protéomique dans les différentes conditions de traitement.

Le choix des anticorps a été réalisé sur 4 protéines parmi lesquelles 3 protéines (VDAC, Eno1 et GAPDH) ont été répertoriées dans l'analyse comparative Label-Free. La quatrième protéine est le peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ), un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans l'adipogenèse et la lipogenèse (Mattevi, Zembruski, et Hutz 2007), dont l'augmentation de l'expression dans le tissu adipeux des souris HFD (Sanchez et al. 2003) et qui a également été considéré comme agoniste utilisé pour traiter des souris obèses (Vidal-Puig et al. 1996; Bays 2004).

L'analyse western blot met en évidence une sur-expression significative de l'Eno1, VDAC, PPAR γ et GAPDH chez les cerveaux de rats traités au gras (HFD) par rapport aux rats témoins (SD) ainsi qu'une forte correction apportée par le GSSE pour les quatre protéines (Figure 68 A, B, C et D). En effet, le GSSE corrige presque toutes les perturbations des protéines du cerveau pour atteindre un niveau plus bas que le contrôle. Ces observations mettent en évidence l'effet protecteur du GSSE sur la lipotoxicité cérébrale permettant ainsi de corroborer l'analyse protéomique.

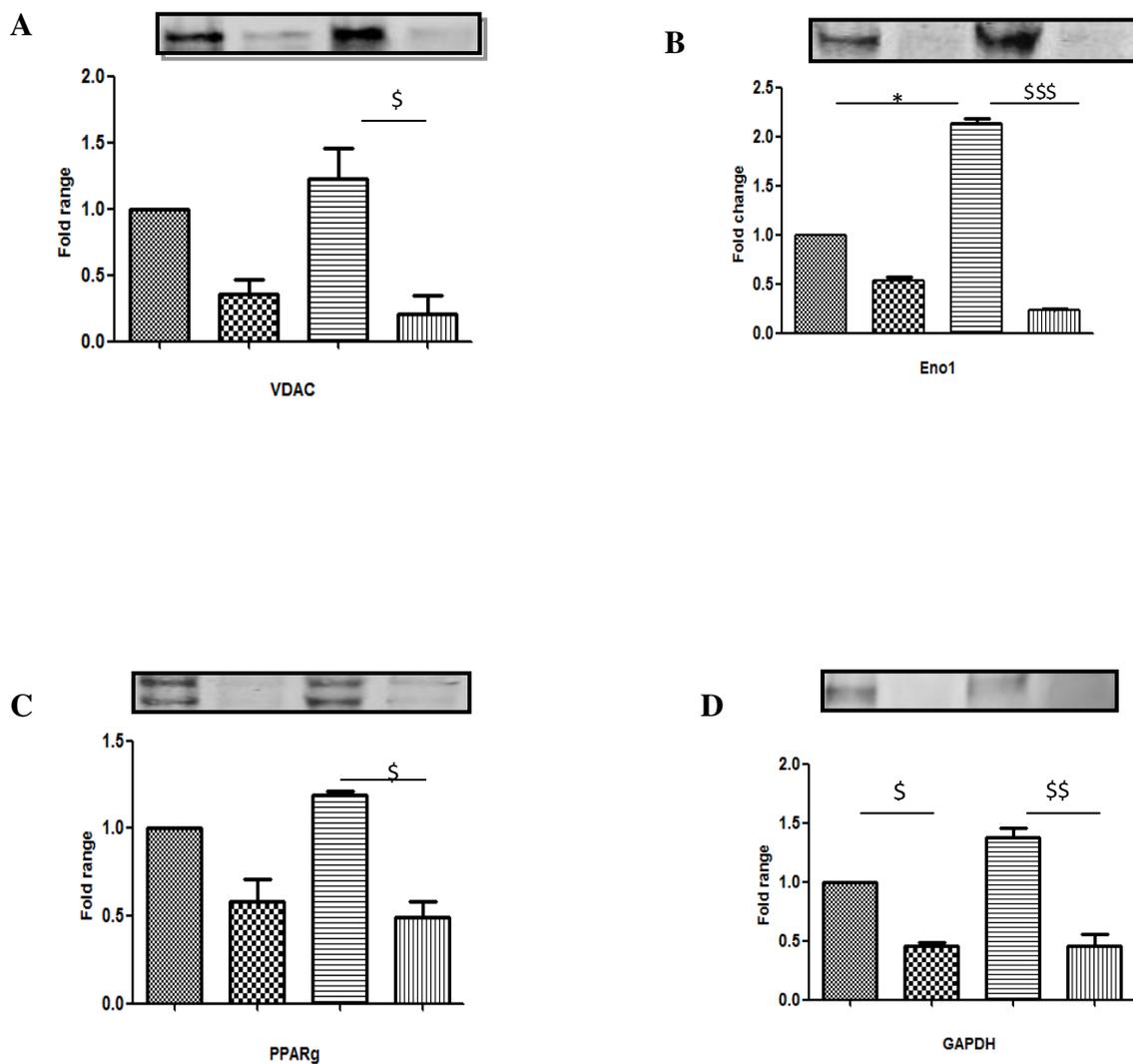


Figure 68: Quantification par western blot d'un ensemble de protéines sélectionnées. Les résultats sont présentés par mesure des intensités des bandes après une analyse western blot : VDAC (voltage-dependent anion channel) (A), Eno1 (alpha-enolase) (B), PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (C) et Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (D).

GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM

(n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs HFD: * $p < 0.05$, HFD vs HG $\$ < 0.05$.

Comme il a été mentionné précédemment, dans l'approche label-free trois protéines parmi les quatre ont été identifiées puis quantifiées dans les différentes conditions. Leur variation va dans le même sens que celle étudiée par western blot. La figure 69 illustre cette variation en utilisant les abondances relatives aux 3 protéines (Eno1, VDAC, GAPDH) dans chacune des conditions de traitement. En effet, le traitement au gras (HFD) engendre une sur-expression (parfois non significative) des 3 protéines que le GSSE, administré en co-traitement, corrige significativement et ramène les valeurs à celles des témoins (SD).

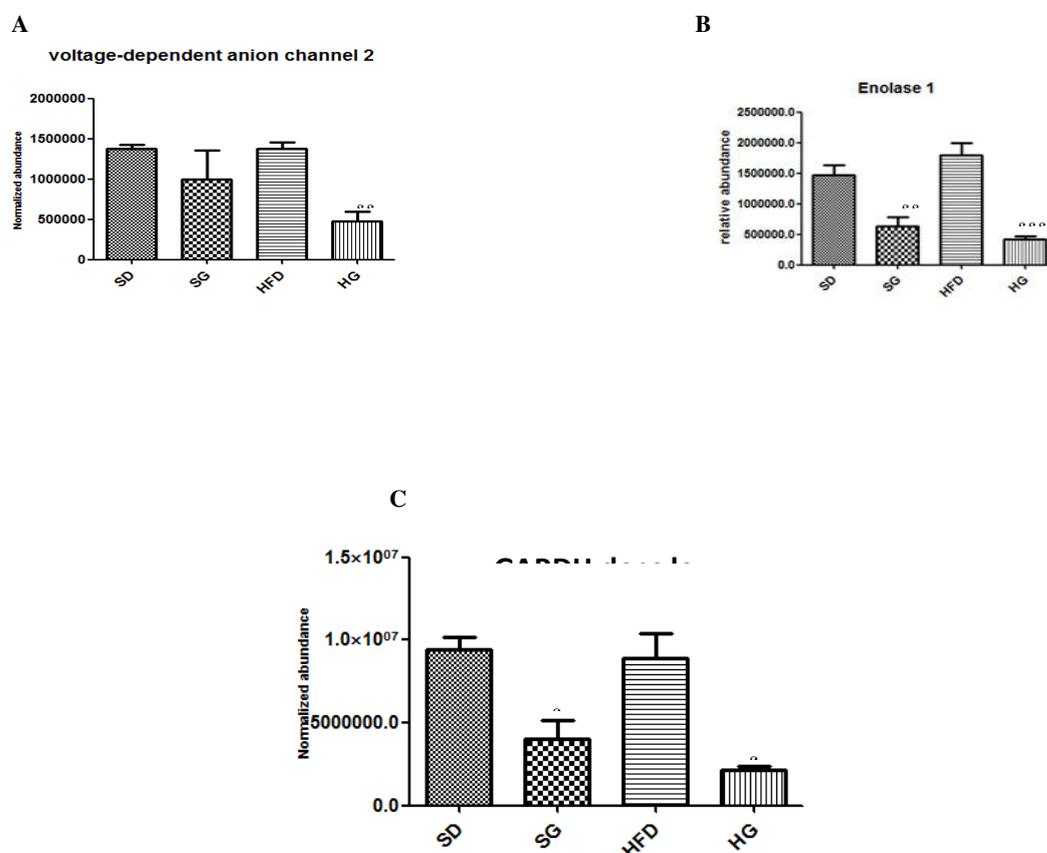


Figure 69: Quantification relative par Label-free. Les résultats sont présentés par mesure des abondances relatives dans les différentes répétitions (biologiques et techniques) pour chaque condition : VDAC2 :Voltage dependent anion channel (A), VDAC (voltage-dependent anion channel) (A), Enolase 1 (alpha-enolase) (B) et Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (C).

GSSE: Grape seed and skin extract; HFD: High fat die; SD: standard diet; HG: HFD+GSSE. Le GSSE a été administré par voie IP à raison de 500mg/kg/j. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5 rats/lot). La différence des données est déterminée par le test ANOVA. SD vs SG ; HFD vs HG: $\$ < 0.05$.

4^{ème} partie

Discussion

Partie 1 : Enzymologie cérébrale

La première conséquence visible d'un régime riche en lipides est une surcharge pondérale pouvant aller jusqu'à l'obésité. Les régimes alimentaires contenant plus de 30% des apports énergétiques sous forme de lipides entraînent en effet le développement d'une obésité chez les rats, due à une augmentation de la prise calorique (West et York 1998). Dans cette étude in vivo, nous avons décrit la pertinence d'un modèle expérimental d'obésité induite par un régime alimentaire à haute teneur en graisses HFD. Ainsi des rats Wistar soumis pendant 8 semaines à un régime composé de lipides comptant pour 39% des calories totales, ont une masse corporelle supérieure à celle des rats soumis à un régime standard (5% de lipides). Le régime alimentaire HFD n'a aucun effet sur le poids relatif du cerveau et du rein.

Toutefois, l'obésité n'est pas uniquement un problème de surcharge pondérale et elle est à l'origine de nombreuses altérations (Saltiel 2000). Un régime HFD induit une accumulation sélective des différentes espèces lipidiques dans le cerveau comme le cholestérol et les phospholipides. Le taux de triglycérides dans le cerveau reste inchangé. Ces résultats, excluant la participation des triglycérides dans la lipotoxicité cérébrale, sont en faveur avec l'implication du cholestérol et les phospholipides comme médiateurs potentiels de la lipotoxicité cérébrale liée à l'obésité (Leduc et al 2010). Une corrélation positive a aussi été établie entre le taux élevé du cholestérol et la sensibilité aux maladies neurodégénératives (Flirski et Sobow 2005).

De plus la LDH est un biomarqueur sensible pour les maladies cardiaques. C'est une enzyme dépendante du Zn et impliquée dans le métabolisme du glucose. Par conséquent, toute nécrose touchant la membrane du foie du cœur induit une fuite de ces enzymes dans la circulation sanguine (Onyema et al. 2006). En effet, une augmentation d'un facteur 2 de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) au niveau des cerveaux des rats traités au gras (HFD) a été observée. Cette augmentation pourrait être associée à l'activation des astrocytes et l'activation de la LDH neuronale par rétrocontrôle négatif vue la diminution d'énergie et l'absence d'oxygène. La diminution des taux énergétiques neuronaux permet d'activer l'expression des enzymes responsables de la glycolyse au niveau des astrocytes qui vont mobiliser leurs réserves en glucose afin de satisfaire les besoins neuronaux.

Le HFD provoque également une augmentation de l'activité tyrosinase qui est une enzyme à cuivre. Cette augmentation a été préalablement observée dans l'étude de l'effet d'un stress oxydatif sur des cellules cérébrales induisant une mort cellulaire via l'activation des MAPK (Hasegawa 2010). Le HFD induit donc une surcharge en cuivre au niveau des cerveaux de

rats obèses. Une augmentation nette du niveau de la SOD totale a été observée au niveau des cerveaux de rats obèses. Cette enzyme, étant un ensemble de metallo-protéines, confirme la surcharge cérébrale en métaux. Ceci montre l'aggravation du stress oxydatif induit par le régime riche en graisse (HFD). Cette perturbation à la hausse de l'homéostasie des métaux de transition provoque des lésions cérébrales graves et peut conduire à la démence vasculaire. Cet excès a bien été constaté récemment dans plusieurs recherches portées sur l'étude des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. En outre le traitement par le HFD induit une légère augmentation de l'activité lipase contre une augmentation significative de la glucose-6-phosphatase (G6P). Cette augmentation est directement liée à un dysfonctionnement métabolique touchant le cerveau suite à un traitement HFD. Il a été communément connu que la gluconéogenèse ne se produit que dans le foie, le rein, l'intestin ou le muscle (Chen, Chiang, et Ma 2014). Des études émergentes, cependant, prouvent que ce processus de gluconéogenèse peut également se produire dans le cerveau. Cette voie de la gluconéogenèse trouvée dans les astrocytes est de plus en plus reconnue comme une source de glucose alternative importante pour les neurones, en particulier dans la tumeur cérébrale (Yip et al. 2016). D'autres études, selon lesquelles un sous-ensemble d'astrocytes contient également G6P suggère qu'ils sont compétents dans la gluconéogenèse, servant de voie d'énergie potentielle pour les neurones (Garrigos et al. 1993). Il a été suggéré que la G6Pase puisse être silencieux dans des conditions physiologiques et devenir activé en période de stress (Ghosh et al. 2005). Il est également possible que la G6Pase ne soit pas une enzyme essentielle pour que les astrocytes libèrent du glucose et utilisent plutôt un gradient de concentration de glucose pour favoriser le flux de glucose des astrocytes vers les neurones (Gandhi et al. 2009). Nos résultats vont dans le même sens que les hypothèses émises à partir de ces différentes études. En effet, un stress par le HFD a fait augmenté significativement l'activité du glucose 6 phosphatase.

Il en est de même pour le pyruvate déshydrogénase. Ce complexe enzymatique est considéré comme cible émergente pour le traitement du syndrome métabolique. Afin de maintenir une concentration stable d'ATP au cours d'un cycle cellulaire, les cellules nécessitent l'utilisation efficace des acides gras et du glucose, qui est commandé par le pyruvate déshydrogénase. Nos résultats montrent qu'un traitement riche en graisse (HFD) induit une augmentation significative de l'activité pyruvate déshydrogénase.

Le HFD entraîne aussi des perturbations des calpains qui sont une famille de cystéine protéases dépendantes du calcium. Les calpains clivent des cibles protéiques spécifiques ce

qui leur confère un rôle énorme dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Awada et al. 2010). L'activation des calpains induit la mort cellulaire puisqu'elles dégradent beaucoup de molécules essentiels pour la survie cellulaire (Bukowska et al. 2012). Cette activation est probablement due à l'entrée massive du calcium à l'intérieur des cellules nerveuses qui active les calpains et conduit à la mort cellulaire par excitotoxicité. Cette dernière apparaît suite aux mouvements non contrôlés du calcium entre les différents compartiments intracellulaires conduisant à des anomalies cellulaires.

Sans aucun doute le résultat le plus important de la présente étude est l'effet antiobésité, ainsi que le rôle protecteur contre les effets délétères de l'alimentation grasse, de notre extrait de pépin de raisin (GSSE). Plusieurs études antérieures ont prouvé que le GSSE est un antioxydant particulièrement efficace. Les propriétés anti-oxydantes du GSSE s'expliquent en partie par la capacité des polyphénols à piéger directement les anions superoxydes, les radicaux hydroxyles et les radicaux produits par la peroxydation lipidique (Charradi et al. 2011).

D'autres part des chercheurs (Décordé et al. 2009) ont montré, pour la première fois, que le GSSE pourrait être un agent anti-obésité. La consommation régulière des polyphénols de pépins de raisin a permis de réduire le développement de l'obésité induite et d'empêcher l'apparition des troubles métaboliques associés y compris les perturbations des sécrétions hormonales par les adipocytes.

Ainsi un co-traitement au GSSE s'est opposé efficacement à toutes les altérations apportées par le régime gras. Le GSSE a diminué toutes les perturbations ayant trait au gain de poids, la surcharge en métaux de transition, le dysfonctionnement métabolique, l'augmentation du calcium et le stress oxydatif.

Le GSSE s'est montré protecteur contre ces conditions de stress lipidique d'où le rétablissement significatif de l'activité l-tyrosinase chez les cerveaux du lot HFD+GSSE. D'autres études confirment l'effet protecteur du GSSE contre un stress oxydatif cérébral. En effet, un extrait d'acétate d'éthyle, constitué de neuf flavonoïdes et isolé des feuilles de *B. Balsamifera*, possède une activité anti-tyrosinase (Pang et al. 2014). Cette même activité antityrosinase a été aussi étudiée par Yuan et al pour montrer l'effet protecteur de cet extrait contre le cancer par inhibition de l'activité tyrosinase (Yuan et al. 2016).

Le GSSE peut aussi protéger contre les altérations touchant quelques enzymes des voies métaboliques. En effet, une augmentation très significative de l'activité lipase contre une inhibition du pyruvate deshydrogénase a été observée dans les cerveaux suite à un traitement

au GSSE. La lipase est l'enzyme clé de la lipolyse qui agit par transformation des triglycérides en acides gras et en glycérol. Il a été montré dans des études portant sur les cardiomyocytes, que le TAG (Triacylglycérol) n'est pas toxique et que son accumulation peut être protégée par la canalisation des acides gras loin des voies métaboliques toxiques (Listenberger et al. 2003). D'autres travaux sur le cœur ont indiqué que des modifications de la synthèse du TAG peuvent être responsables de l'inhibition de l'accumulation des lipides dans les cardiomyocytes (Pulinilkunnil et al. 2013). Ainsi, l'augmentation de l'activité lipase cérébrale après traitement au GSSE s'avère être bénéfique dans les cerveaux de rats du lot HFD+GSSE. Nos résultats concordent avec des résultats antérieurs, suggèrent que l'effet stimulant du GSSE sur la lipase cérébrale est une forme de correction apportée aux cerveaux de rats obèses. En effet, le GSSE met en place une forme d'adaptation, certainement insuffisante, au stress oxydatif apporté par le traitement au HFD. Comme il a été le cas dans l'étude de la cardiomyopathie induite par le diabète (Pulinilkunnil et al. 2013), nous concluons également que le suivi de l'augmentation de l'activité lipase dans le cerveau permet d'améliorer la stéatose en général et particulièrement la lipotoxicité cérébrale.

D'autres études préalables ont montré que l'activité pyruvate déshydrogénase kinase dans le muscle cardiaque augmente chez les individus obèses et diabétiques (McAinch et al. 2015). D'autres ont montré que suite à cette augmentation, il y a une perturbation de la voie de phosphorylation ce qui induit une sur-expression du complexe pyruvate déshydrogénase (Lee 2014) ce qui confirme nos résultats de mesure de l'activité Pyruvate deshydrogénase. Une autre étude sur les cerveaux de rats ischémiés a montré que le complexe pyruvate deshydrogénase (PDC) augmente dans les cerveaux de rats ischémiés et qu'un traitement neuroprotecteur a pu ramener l'activité PDC au niveau des rats témoins (Geng et al. 2015). Ces résultats confirment encore nos observations qui ont montré qu'un traitement antioxydant au GSSE protège contre l'augmentation de l'activité pyruvate deshydrogénase.

Il en est de même pour l'effet du GSSE sur les calpains. Suite à un co-traitement du GSSE avec le régime HFD, l'activité des calpains est très proche de celle des contrôles (SD) et ceci témoigne une fois de plus de l'effet protecteur qu'exerce le GSSE sur le cerveau dans le cas d'une lipotoxicité. Cette faible activité peut-être due à une action directe inhibitrice du GSSE sur les calpains ou à une action indirecte via la modulation du taux de calcium intracellulaire libre (il existe la possibilité qu'il soit lié à l'un des composés polyphénoliques du GSSE) et par conséquent la modulation de son activité.

IL est à souligner qu'à partir de nos résultats, un lien direct est établi entre l'activité de l'acétylcholinestérase et le GSSE au niveau des cerveaux de rats obèses. Le GSSE pourrait être considéré comme un agent préventif contre la lipotoxicité cérébrale et comme un médicament supplémentaire dans le traitement des troubles cérébraux par inhibition de l'activité acétylcholinestérase (AChE) ce qui pourrait influencer la transmission cholinérgique. Comme protecteur contre tout stress oxydatif, le GSSE permet de restaurer la libération et le recyclage des neuro-transmetteurs tels que le glutamate, l'acétylcholine et la dopamine. Des travaux antérieurs ont montré que, suite à un stress oxydatif, on pourrait enregistrer un épuisement des réserves énergétiques qui pourrait engendrer une inhibition de la libération des neurotransmetteurs (Boulland et Levy 2005). Ce résultat est bien confirmé par la mesure de l'activité Acétylcholinestérase qui a significativement augmenté au niveau des cerveaux après un traitement HFD. Ceci pourrait être visualisé par une perturbation du fonctionnement astrocytaire et synaptique suivi d'un dérèglement de la neurotransmission.

Nos résultats montrent qu'un traitement HFD induisant un stress oxydatif au niveau du cerveau est caractérisé aussi par une inhibition de quelques activités d'enzymes antioxydantes telle que la superoxyde dismutase (SOD). En effet, la mesure de l'activité de la SOD totale montre qu'un traitement HFD fait diminuer l'activité SOD et qu'un traitement au GSSE rétablit cette diminution. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Charradi K et al 2012 qui ont trouvé qu'un traitement HFD inhibe la Mn-SOD en plus de la SOD totale et que le GSSE corrige cette inhibition apportée par le gras. D'autres travaux (Safwen et al. 2015) ont montré qu'une ischémie a un effet sur d'autres cofacteurs au niveau tels que le fer, Cu. Le GSSE corrige cet effet délétère du gras et ramène les valeurs proches de celles des témoins. D'après ces résultats, le GSSE semble moduler les activités des isoformes de la SOD en agissant soit sur leurs expressions (tel est le cas de la Mn-SOD) soit sur leurs cofacteurs (Cu, Zn, Fe, Mn). Ce résultat nous a emmené à se demander à propos de l'implication du GSSE dans le métabolisme des métaux et dans le maintien de l'homéostasie en cas de stress. Cette hypothèse a bien été confirmée dans la première partie de ce travail où l'analyse protéomique des voies de signalisation impliquées confirme l'implication du GSSE dans la régulation de l'équilibre cellulaire en cas de stress.

Chez les rats HFD l'activité CAT augmente considérablement vue la grande génération des radicaux libres et surtout de l'anion superoxyde qui est transformé par la SOD en peroxyde d'hydrogène (McCord et Fridovich 1969). Ceci a été confirmé par la mesure de H₂O₂ dans le

cerveau qui a augmenté chez les rats HFD par rapport aux témoins. A forte concentration, le H_2O_2 stimulerait l'activité et l'expression CAT. Dans le cas des rats du groupe HFD+GSSE, l'activité de la CAT est un peu plus faible que celle des animaux Contrôle, ceci est due probablement à l'effet antioxydant du GSSE qui joue le rôle d'un piègeur de radicaux libres. Ce rôle s'exercerait surtout sur le peroxyde d'hydrogène plutôt que sur l'anion superoxyde (Qin et al. 2010b). Lors du traitement par le GSSE dans les conditions standards, l'activité CAT diminue par rapport à celle des rats Contrôle, ce qui plaide en faveur de l'effet antioxydant qu'exerce le GSSE sur le peroxyde d'hydrogène.

Le dosage du calcium cérébral est un dosage important dans l'étude de stress vue la grande implication de cet ion dans les processus d'excitotoxicité, de fabrication de radicaux libres et d'apoptose (Starkov 2010). Au cours de cette étude nous avons démontré que le taux de calcium cérébral augmente de plus de 50% après un traitement riche en lipides. Cette augmentation pourrait être due au système de maintien de l'homéostasie grâce aux détecteurs de calcium neuronal (Yarlagadda et al. 2007). Suite à la dépolarisation de la membrane due à la rupture du stock énergétique cellulaire, les canaux calcique voltage dépendant s'ouvrent et permettent l'entrée du calcium à l'intérieur de la cellule. L'accumulation du calcium intracellulaire va provoquer l'exocytose des neuromédiateurs, l'activation soutenue des neurones vue que les astrocytes sont incapables de recapter l'excès des neurotransmetteurs, et ainsi l'entrée massive de calcium à l'intérieur de la cellule. Cette entrée excessive du calcium à l'intérieur de la cellule contribue à l'appauvrissement du milieu extracellulaire en calcium. Le calcium sera ensuite importé de la circulation sanguine ce qui augmentera la teneur cérébral en calcium. Le GSSE par contre permet de garder un état homéostatique agissant ainsi soit sur la dépolarisation des neurones, soit sur le métabolisme du calcium cérébral en gardant une expression stable des détecteurs de calcium neuronal semblable à celle du contrôle, soit sur le stockage du calcium extracellulaire au niveau des membranes plasmiques. Au niveau plasmatique nos résultats indiquent que chez le groupe HFD le taux de calcium plasmatique est comparable à celui du groupe contrôle. On ne remarque pas d'effet du GSSE sur la variation du taux de calcium plasmatique.

Le lactate, un des maillons clés du cycle de la glycolyse, est considéré comme un médiateur primordial pour le fonctionnement cérébral. Etant le produit de la réaction de la lactate déshydrogénase (LDH), le taux du lactate cérébral se trouve significativement élevé chez les rats HFD. Ceci pourrait être expliqué par un résultat précédent qui montre une sur-expression

de la LDH chez les rats obèses. Ces résultats sont bien confirmés par Harvie, et al 2014 qui ont trouvé que chez des sujets atteints d'un cancer il y a augmentation du taux de lactate ainsi que de l'activité LDH. Un traitement au GSSE corrige cette augmentation et ramène les valeurs à celles des rats standards. Ceci suggère que le GSSE avec son rôle de scavenger, a pu protéger le cerveau contre la lipotoxicité induite par le HFD. Ces résultats sont confirmés par l'étude in vitro effectuée par (Shen et al. 2007). Ces chercheurs ont montré l'effet protecteur des polyphénols sur les hépatocytes par le biais du dosage de LDH et du lactate dont les variations se sont révélées en accord avec nos résultats dans les différentes conditions de traitement.

Le dosage du peroxyde d'hydrogène a révélé que le taux de H₂O₂ dans les cerveaux de rats HFD est à peu près trois fois plus que celui des animaux SD. Ce résultat est justifié par les taux élevés des radicaux libres et l'activité importante de la catalase. Pour les rats co-traités par le GSSE (HFD+GSSE), le taux de peroxyde d'hydrogène est plus important que celui des animaux SD et moins importants que ceux du groupe HFD.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Jin Tae Hong et al. (2012) qui ont trouvé une augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène de 50% suite à un stress oxydatif exercé au niveau cérébral et une correction avec l'extrait de thé vert chez les gerbilles a été bien élucidée.

Partie 2 : Protéomique du cerveau

L'obésité est depuis quelques années reconnue comme un des fléaux du XXI^e siècle affectant environ 10% de la population adulte mondiale. Le passage de l'obésité au stade de pandémie est le résultat de multiples facteurs dont une mauvaise hygiène alimentaire et une sédentarité croissante. La découverte récente de l'existence d'un état inflammatoire chronique au cours de l'obésité pouvant intervenir dans la physiopathologie de la maladie et de ses nombreuses complications fait aujourd'hui l'objet d'intenses investigations. Or, l'étude des acteurs majeurs de ce syndrome inflammatoire a bien été élucidée sur plusieurs organes cibles. En effet, il a été montré que l'autotaxine (ATX), l'adiponectine et la résistine sont les médiateurs de l'inflammation sécrétés par le tissu adipeux (Roche et al. 2007). Si le rôle de ces facteurs dans la régulation du métabolisme est bien établi, l'effet de l'obésité sur d'autres organes n'est pas toujours bien connu. Etant donné que le cerveau est fréquemment associé à différentes complications, la lipotoxicité cérébrale dans ces situations pathologiques est une

problématique importante pour la santé publique. Il est notamment intéressant d'étudier l'effet de la lipotoxicité induite par un régime « riche en gras » (HFD) sur le cerveau et voir l'effet protecteur du GSSE. De nos jours, le dysfonctionnement du cerveau est considéré comme l'une des principales perturbations liées à l'obésité. Afin de mieux comprendre ce phénomène et remédier au problème de l'obésité en relation avec le cerveau, nous nous sommes intéressés à l'étude des changements des protéines et des voies métaboliques touchées par le gras et corrigés par le GSSE.

Plusieurs études ont montré la relation existant entre l'obésité et les maladies neurodégénératives en étudiant l'influence du tissu adipeux sur le système nerveux central (SNC) afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques (Awada et al. 2014). A ce niveau apparait l'originalité de notre travail qui consiste à présenter une nouvelle approche thérapeutique pour l'obésité en cherchant à voir de près sa relation étroite avec le cerveau et pouvoir ainsi trouver une piste thérapeutique contre cette pathologie.

De nos jours, les stratégies « omics » (protéomique, transcriptomique, lipidomique...) sont en plein essor pour tenter d'identifier les biomarqueurs d'intérêts thérapeutiques. Le développement de nouveaux outils, notamment en **spectrométrie de masse** ouvre de nouvelles perspectives dans la recherche de biomarqueurs protéiques prédictifs de réponse.

Un biomarqueur protéique est une protéine ou un fragment protéique dont l'expression ou la modification est caractéristique d'un état normal, pathologique ou de la réponse à un traitement pharmacologique (Boja et al. 2011).

Le dysfonctionnement cérébral est aujourd'hui considéré comme l'un des principaux défauts liés à l'obésité, mais aussi pour de nombreux troubles métaboliques. Mettre l'accent sur les modifications des protéines et celles des voies de signalisations pourrait servir de référence afin de mieux comprendre et finalement fournir des options thérapeutiques pour la maladie.

Dans ce travail, nous avons entrepris une analyse protéomique portant sur le cerveau qui n'est pas, à priori, organe cible de l'obésité ce qui donnerait un aspect original à notre étude. Dans ce contexte, plusieurs autres travaux de recherche ont été effectués sur des organes cibles tels que le foie, le pancréas... Antérieurement, une analyse protéomique a été effectuée sur le tissu adipeux afin de trouver un lien reliant les biomarqueurs identifiés entre les deux organes et pouvoir remédier à différentes maladies. Dans ce but, une approche protéomique quantitative a été entreprise pour identifier les changements d'expression des protéines dans le

cerveau de rat en utilisant un modèle d'obésité induit par un régime riche en graisse (HFD). Nos résultats montrent que, dans le cerveau, un régime HFD déclenche une altération coordonnée de diverses voies métaboliques telles que la voie de signalisation du calcium, la phosphorylation oxydative, la glycolyse/néoglycogénèse et la voie de signalisation HIF. Il convient de mentionner que le choix de l'utilisation du protéome du cerveau entier repose sur au moins deux raisons principales. La première est liée au fait que plusieurs travaux récents ont souligné que la neuro-inflammation induite par l'obésité s'étend au-delà de l'hypothalamus pour affecter des domaines directement liés à la cognition comme le cortex frontal et pariétal ainsi que l'hippocampe (Nguyen et al. 2014; Sherman et al. 2016). Deuxièmement, plusieurs aspects du modèle HFD utilisé ont été décrits précédemment et l'approche protéomique entreprise dans notre étude peut rajouter une pièce substantielle aux résultats précédents si elle est réalisée dans les mêmes conditions expérimentales.

Néanmoins notre approche portant sur l'utilisation du protéome total du cerveau souffre de certaines limitations. En effet, s'il est vrai que les approches de la neuroprotéomique, visant la découverte du tissu cérébral total, reflètent principalement les protéines les plus abondantes, elles ne parviennent pas à découvrir celles les moins abondantes. Mettre le point sur des protéomes ciblés après la compartimentation tissulaire pourrait certainement fournir des aperçus spécifiques sur la fonction du cerveau et révéler ainsi des différences pertinentes dans la constitution protéique des régions cérébrales touchées.

Afin d'identifier un large panel de protéines candidates, les protéomes sont comparés par des approches de quantification relative de spectrométrie de masse ou d'électrophorèse bidimensionnelle (EBD). La deuxième phase est basée sur l'étude d'un très grand nombre d'échantillons en recourant à une technique plus standardisée permettant une quantification absolue (Rifai et al. 2006).

La phase initiale de ce projet avait pour but de déterminer l'approche protéomique la plus adéquate pour identifier des protéines candidates. Les protéomes des tissus cérébraux de rats SD, SD+GSSE, HFD et HFD+GSSE ont été comparés en utilisant deux approches (EBD, label free). Il s'est avéré que la quantification relative sans marquage par spectrométrie de masse était la plus appropriée à notre étude. Elle permettait de limiter (i) la quantité d'échantillon utilisée par réplicat, (ii) les coûts liés au marquage, (iii) le temps technique et (iiii) les étapes analytiques sources de biais potentiels. L'utilisation d'un spectromètre de masse haute résolution présentant une excellente vitesse de balayage et une très bonne

sensibilité (LTQ-Orbitrap) a permis d'obtenir des résultats très reproductibles avec un maximum d'informations en matière d'identification. La haute résolution a permis d'assurer une quantification de qualité, réalisée à l'aide d'un outil bioinformatique dédié, le logiciel Progenesis-LCMS.

Au cours de cette première phase, d'autres enseignements ont pu être tirés. En effet, malgré un intérêt évident, souligné précédemment, l'extraction des protéines à partir des cerveaux semble être un point critique vu que cet organe est très riche en lipides. Or, dans une analyse comparative visant à identifier des biomarqueurs, il n'est pas possible de tolérer un biais important en amont de l'analyse.

Lors de ces premiers travaux, on a pu montrer l'existence de différences significatives des protéines présentes dans chacune des conditions de traitement aussi bien avec l'approche EBD que Label-free. Après ces travaux, nous nous sommes intéressés à la méthode Label-free qui nous a permis de procéder à une quantification relative des protéines significativement différenciées. Nous nous sommes orientés vers l'étude du protéome cérébral afin d'analyser l'expression des biomarqueurs identifiés dans les cerveaux et analyser les voies des différents métabolismes touchés par le HFD et corrigé par le GSSE.

Nos résultats montrent que, dans le cerveau, le régime gras (HFD) déclenche une modification coordonnée de différentes voies métaboliques, y compris celle de la signalisation du calcium, la phosphorylation oxydative, la glycolyse / néoglucogenèse et la voie de signalisation de HIF. En outre, la voie d'activation plaquettaire et la jonction / leucocytaire migration transendothéliale serrées ont également été affectées. Au cours de la respiration cellulaire, l'O₂ est réduit en H₂O dans les mitochondries par la phosphorylation oxydative, qui produit de l'énergie sous forme d'ATP nécessaire aux diverses fonctions cellulaires. Au cours de ces réactions, les électrons se déplacent à travers la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale (ETC). Les complexes I à IV fonctionnent pour établir un gradient de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie qui crée le gradient d'énergie électrochimique pour induire la synthèse de l'ATP par le complexe V. Cette voie est sensiblement sous-exprimée dans les cerveaux de rats HFD. Nous avons constaté que les 4 complexes (I, II, III et IV) ont été inhibés. Cette inhibition a été remarquée par une baisse de leurs activités enzymatiques, alors que quelques ATPases du cinquième complexe de la chaîne respiratoire ont été sur-exprimées, ce qui confirme pleinement un travail préalable (Raghavan et al. 2012). La conclusion la plus frappante était une baisse de la quantité de plusieurs sous-unités OXPHOS chez la souris alimentée par un régime HFD. En effet, l'activité et l'assemblage de la plupart des complexes OXPHOS a été réduite à environ 50 à 60% du niveau basal. Ce résultat

rappelle un récent travail portant sur le lapin nourri de cholestérol comme modèle pour la maladie d'Alzheimer, chez lequel les protéines de la phosphorylation oxydative mitochondriale sont sous-exprimées chez les lapins traités au gras (Cuadrado-Tejedor et al. 2011).

En outre, la régulation de l'homéostasie du calcium dans le cerveau joue un rôle clé dans la fonction cérébrale et la communication cellulaire (Adibhatla et Hatcher 2008). Nous avons montré dans la présente étude que la voie de signalisation du calcium a été altérée dans les cerveaux de rats HFD où un niveau élevé de calcium a été détecté par rapport aux rats SD. Ce dernier résultat va plutôt bien dans le même sens qu'un précédent travail sur les lésions induites aux neurones de la moelle épinière par l'acide arachidonique suggérant l'effet toxique de HFD moyennant une élévation du taux de calcium intracellulaire (Hamlaoui-Gasmi et al. 2012). Parmi ces protéines, la VDAC et l'ATPase, Ca^{2+} transport plasma membrane (PMCA) sont impliquées dans cette voie. Des études récentes sur les mitochondries du foie de souris diabétiques traitées au gras (HFD) (Gonzalez et al. 2016) ont également montré une abondance accrue de la protéine VDAC qui peut affecter l'aspect condensé des mitochondries du foie par l'augmentation des jonctions 'crista junctions'. La protéine VDAC-1 remplit plusieurs fonctions clés dans le cerveau, y compris le maintien de la plasticité synaptique, la transition de la perméabilité mitochondriale (MPT), la régulation de la forme et la structure des mitochondries, ainsi que l'interaction des enzymes glycolitiques avec les mitochondries et l'apoptose (Safwen et al. 2015). Notre approche protéomique a révélé que VDAC1 est sur-exprimée sous traitement HFD comme ce fut le cas dans l'hippocampe à partir de modèles de souris transgéniques AD (Bagchi et al. 2003).

Le cerveau est considéré comme l'organe le plus vulnérable au stress oxydatif, car il contient un niveau élevé d'acides gras poly-insaturés (AGPI) sensibles à la peroxydation des lipides, consomme de grandes quantités d'oxygène pour la production d'énergie et dispose des défenses antioxydantes les plus faibles par rapport à d'autres organes (Simeone et al. 2011). La consommation d'énergie du cerveau est principalement assurée par le métabolisme du glucose et de l'oxygène par la phosphorylation de l'ADP en ATP. Ces données confirment les travaux antérieurs étudiant le lien entre l'obésité et le diabète d'un côté et leur relation avec la voie de la glycolyse / néoglucogenèse de l'autre (Safwen et al. 2015). Notre analyse protéomique a mis en évidence l'implication de nombreuses protéines du métabolisme du glucose. A partir de 'gene ontology' trois protéines, à savoir ENO1, ENO2 et Hspa9 associées à cette voie, sont constamment accumulées alors que deux autres protéines (GAPDH et GPD2) sont sous-exprimées dans les cerveaux de rats HFD. Les enzymes de la glycolyse ont besoin

d'ATP pour leurs actions catalytiques, et dès qu'une augmentation des protéines de l'ATP synthase a été observée chez les rats HFD, il est probable que l'ATP généré contribue à la régulation de la gluconéogenèse et l'augmentation du glucose dans des échantillons de cerveaux HFD.

La conclusion la plus pertinente tirée de notre étude est la protection offerte par le GSSE contre l'effet délétère du régime riche en lipides (HFD). Comme le GSSE a été administré pendant 8 semaines, sa protection reflète un effet préventif contre le stress oxydatif induit le régime HFD. À notre connaissance, notre travail est la première étude moléculaire qui montre que le GSSE est protecteur contre la lipotoxicité cérébrale puisqu'il inhibe significativement les voies de la signalisation du calcium et celle de la phosphorylation oxydative qui ont été altérés par le stress oxydatif. Il est intéressant de rappeler que le GSSE s'est révélé protecteur contre la chimiothérapie (Catterall 2000) et la toxicité induite par l'ail (Ahn et al. 2011) en raison de ses propriétés antioxydantes (Charradi et al. 2012) et anti-apoptotiques (Richmond et al. 2010).

Le blocage des canaux calciques par la nifédipine induit une réduction des symptômes de l'épilepsie humaine (Simeone et al. 2011) suggérant une utilité thérapeutique potentielle de bloqueurs de canaux calciques de type L chez les patients épileptiques. Les flux de calcium sont assurés par plusieurs types de canaux calciques qu'on trouve dans les tissus excitables tels que le cœur, le pancréas et le cerveau (Catterall 2000). Le GSSE pourrait inhiber l'effet de HFD sur l'abondance du calcium ou l'activité calcique et son mode d'action devrait être mieux étudié en utilisant les inhibiteurs calciques comme la nifédipine ou le vérapamil. A partir de notre analyse protéomique, on peut conclure que le GSSE a inhibé l'activation de la voie de signalisation du calcium en agissant en partie sur les protéines VDAC (Voltage dependent anion channel), Ca²⁺ transporting ATPase and Plasma membrane channel anion (PMCA). Nos résultats sont en accord avec les travaux récents dans le domaine qui montrent que le traitement HFD provoque une augmentation des médiateurs intracellulaires comme le Ca²⁺ et le GSSE corrige ce niveau vers des valeurs proches du témoin SD (Charradi et al. 2012). D'autres travaux ont montré qu'un extrait de proanthocyanidines inhibe la mort cellulaire induite par le glutamate par inhibition de la signalisation du calcium et du NO dans les neurones hippocampiques de rats (Ahn et al. 2011). Il est tentant de spéculer sur l'utilisation du GSSE dans la prévention de ces troubles du cerveau, caractérisées par une dérégulation du calcium, soit seul, soit comme adjuvant aux bloqueurs calciques communs actuels comme le vérapamil ou la nifédipine.

L'augmentation du Ca^{2+} déclenche également différentes voies apoptotiques telles que celles impliquant l'activation des calpains, une famille de protéases cystéine et calcium dépendantes qui clivent des cibles protéiques spécifiques conférant aux calpains un rôle très important dans diverses maladies neurodégénératives (Richmond et al. 2010). Ce résultat a été soutenu par la démonstration de l'activation accrue des calpains suite à un régime HFD et par l'effet prophylactique du GSSE.

De plus, des résultats concordants ont été décrits dans la littérature concernant la signalisation HIF (hypoxia induced factor) et l'expression du gène FTO (Fat) (Jia et al. 2008, 2011; Berulava et al. 2013) . Il est généralement admis que la voie HIF est surexprimée dans de nombreux types de cancers grâce à une expression accrue de HIF1b et HIF2b qui régule les l'activité mitochondriale en augmentant la transcription de la sous- unité IV-2 de la chaîne de transport d'électrons (Yang et al. 2014). Plusieurs études ont rapporté la forte influence de la voie de signalisation de HIF sur le métabolisme des lipides et du glycogène. Le HIF peut améliorer la synthèse du glycogène sous hypoxie dans diverses cellules par induction de la première enzyme de la néoglucogenèse et peut également induire l'isoforme lipin 1 de la phosphatidate phosphatase, qui est une enzyme impliquée dans la biosynthèse des triglycérides (Mylonis et al. 2012). Comme le métabolisme des lipides et du glucose ont été modifiés par le régime gras (HFD) et corrigé avec le GSSE, ce dernier pourrait être considéré comme un agent préventif potentiel contre l'effet délétère et insidieux du régime HFD sur l'homéostasie cérébrale depuis des décennies. Sur cette base, nous proposons que l'augmentation de l'expression des protéines appartenant à la voie de signalisation HIF dans les cerveaux de rats traités au régime HFD puisse être l'un des mécanismes de défense et de protection contre le stress oxydatif médié par les ROS. Le GSSE a eu un effet protecteur en rétablissant l'expression de plusieurs protéines surexprimées (Eno1, Eno2, VDAC, calcium signaling Atp2b2 ou Cadps) ousous exprimées (SNAP-25, Gapdh, Gpd2, Mtco2, PP2RA1, MBP-1). Ainsi, par exemple, l'inhibition de l'enzyme glycolytique Gapdh améliore la vulnérabilité neuronale à un état d'excitotoxicité à la fois in vivo et in vitro par un mécanisme inconnu lié éventuellement à l'échec mitochondrial et améliore également la vulnérabilité de l'amyloïde β de l'hippocampe(Cano-Ramírez et al. 2012). En outre il a récemment été montré que la GAPDH agirait comme une kinase du récepteur de GABA α ce qui constitue un lien entre la glycolyse et la neurotransmission (Laschet et al. 2004).Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de la Gapdh dans la neurodégénérescence par le biais de son activité non-glycolytique dans les cerveaux de patients atteints d'alzheimer (El Kadmiri et al. 2014).

En outre la Gapdh joue un rôle non catalytique en induisant la mort cellulaire après oligomérisation (Qvit et al. 2016) et par l'intermédiaire de son association avec VDAC-1, la Gapdh est capable d'induire la perméabilité de la membrane mitochondriale pro-apoptotique (Tarze et al. 2007).

Une autre protéine clé, la SNAP 25, qui fait partie du complexe SNARE impliqué dans la fusion synaptique vésiculaire, est sous-exprimée suite à un traitement riche en graisse (HFD) comme cela a pu être démontré dans le cerveau de patients atteints d'alzheimer (Greber et al. 1999) ou de la démence vasculaire (Sinclair, Tayler, et Love 2015). Encore une fois le GSSE corrige le niveau de cette protéine synaptique clé.

La MBP-1 est une autre protéine impliquée dans la myélinisation, sous-exprimée chez les rats soumis à un régime HFD, suggérant un effet délétère durable du gras sur le fonctionnement cérébral et dont le GSSE rétablit le niveau à des valeurs proches du SD. Ce résultat doit être comparé à l'effet de la remyélinisation récemment décrit par le resveratrol utilisé à dose élevée (250 mg / kg) dans un modèle de sclérose en plaque induite par la cuprizone (Ghaiad et al. 2016).

Un autre résultat frappant est l'expression accrue de VDAC1 lors de l'exposition au HFD et sa correction par le GSSE. Fait intéressant, le VDAC-1, qui est surexprimée dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, est impliquée dans la toxicité du peptide β conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial puis à l'apoptose. Le VDAC 1 constitue un biomarqueur de présence de lipotoxicité (Martel et al. 2013) et une cible thérapeutique potentielle pour les polyphénols ciblant la mitochondrie tel que le resveratrol par exemple (Liao et al. 2015).

L'approche protéomique quantitative à haute résolution utilisée et confirmée par le Western blot, a révélé que le GSSE prévient efficacement les perturbations métaboliques du traitement HFD. Parmi ces voies métaboliques touchées on peut citer celui de la signalisation du calcium, la glycolyse, le dysfonctionnement des canaux ioniques et la phosphorylation oxydative conduisant à une apoptose induite par la lipotoxicité et donc à un dysfonctionnement cérébral. L'effet protecteur du GSSE s'est matérialisé par la sous-expression de quelques marqueurs caractéristiques tels que VDAC-1, ENO1, GAPDH et PPAR γ . Ce dernier est un facteur de transcription qui joue un rôle primordial dans le phénomène de la lipogenèse (Mattevi, Zembrzuski, et Hutz 2007) et dont l'expression augmente au niveau du tissu adipeux des rats traités au régime HFD (Sanchez et al. 2003).

Dans d'autres études, un agoniste du facteur de transcription PPAR γ a également été utilisée pour traiter les souris obèses (Bays 2004; Vidal-Puig et al. 1996).

En résumé, en utilisant une analyse protéomique quantitative ainsi que des outils biochimiques et bio-informatiques, nous avons identifié les acteurs des voies métaboliques et biologiques qui étaient perturbés au niveau des cerveaux de rats rendus obèses par un régime HFD puis corrigés par un traitement GSSE. Tandis que nos données sont compatibles avec les résultats antérieurs de la lipotoxicité cérébrale en cas d'obésité montrant la protection du GSSE des voies de l'O₂PHOS et celles de signalisation du calcium. Ils ont également dévoilé de nouvelles voies y compris la régulation ascendante de la voie de signalisation HIF dans les cerveaux de rats HFD. Dans le même contexte, le GSSE a abrogé la stimulation des voies de signalisation induite par le régime HFD soit en modulant plusieurs protéines, soit en induisant d'autres qui n'étaient pas affectées par le HFD. Des études sont donc nécessaires afin de traiter le rôle spécifique de ces protéines dans la pathogenèse de la lipotoxicité induite par un régime riche en graisse et la manière dont le GSSE les affecte pour qu'elles soient utilisées comme extrait thérapeutique.

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'avancer sur la compréhension des voies métaboliques cérébrales touchées par l'obésité nutritionnelle chez le rat Wistar puis corrigées par le traitement au GSSE. Pour cela, plusieurs problématiques ont été entreprises pour y répondre.

Dans la première partie nous avons caractérisé et identifié les composants polyphénoliques de notre extrait le GSSE puis suivi les paramètres anthropométriques des rats des différents lots de traitement. Dans la même partie, on a mesuré l'activité de quelques enzymes antioxydantes et d'autres appartenant à différentes voies métaboliques dans les cerveaux des rats afin de déterminer l'effet de l'obésité et celui de GSSE sur les enzymes cérébrales des rats étudiés.

Nous avons conclu que le GSSE est riche en polyphénols totaux majoritairement les non flavonoïdes contenus dans les graines et la peau. Différents composés phénoliques ont été identifiés aussi dans le GSSE dont majoritairement l'acide gallique. Ce dernier fonctionne en synergie avec les différents composés identifiés afin de protéger les rats contre l'effet délétère du gras sur les cerveaux. L'obésité nutritionnelle induite se caractérise par une augmentation du PC et du poids relatif du Tissu adipeux par contre aucun effet sur le poids relatif du cerveau.

En synthétisant nos résultats, nous pouvons conclure que le HFD induit des altérations du statut oxydant et des enzymes cérébrales de différentes voies métaboliques impliquées dans l'obésité nutritionnelle. Le GSSE ramène ces paramètres à la normale.

Dans la deuxième partie nous avons opté pour différentes techniques de protéomique qui nous ont permis d'identifier et quantifier les protéines cérébrales altérées chez le rat suite à un traitement HFD et la correction apportée par le GSSE. Ceci nous a permis de mieux comprendre les voies métaboliques impliquées au niveau du cerveau suite à un traitement riche en graisse tels que celle de la signalisation du calcium, la phosphorylation oxydative et le HIF signaling. Ces troubles métaboliques ont été corrigés par le traitement au GSSE. Plusieurs enzymes (Eno1, Eno2, GAPDH, Hspa) de la voie de la glycolyse/neoglucogenèse ont été altérées dans les cerveaux des rats traités au régime HFD. Le traitement au GSSE corrige ces altérations.

Une dernière partie a été dédiée à une validation des résultats trouvés. Pour ce faire, On a eu recours au WB qui a confirmé l'altération de quelques enzymes appartenant aux différentes

voies métaboliques touchées par le régime HFD. Une restauration de ces activités enzymatiques dans les cerveaux des rats a été remarquée suite au traitement au GSSE.

L'ensemble de ces résultats nous conduit à envisager des perspectives afin de reproduire la même démarche pour caractériser la réponse retrouvée dans d'autres organes tels que les intestins, le foie, le tissu adipeux et de trouver un lien de signalisation protéique avec les protéines de cerveau. Ceci permettra la compréhension de l'axe intestin-cerveau par exemple. Dans ce même cadre nous pourrions essayer de passer à l'étude protéomique des différents compartiments cérébraux après avoir détaillé le protéome cérébral total et étudier les nouvelles protéines impliquées dans les voies de signalisation qu'on n'a pas pu voir dans l'étude du protéome totale.

Il est particulièrement intéressant d'étudier l'effet du HFD et du GSSE sur les lipides du cerveau. Une étude lipidomique permettant de voir les variations au niveau des profils lipidiques pourrait aussi être entreprise afin de comprendre le changement des lipides face à l'obésité et l'effet du GSSE sur ces variations lipidiques.

Références Bibliographiques

A

- Abe, K. 1998. « [Molecular biology and molecular genetics in otorhinolaryngology-- taste receptors and a molecular theory of signal transduction] ». *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 101 (11): 1358-61.
- Adibhatla, Rao Muralikrishna, et J. F. Hatcher. 2008. « Altered Lipid Metabolism in Brain Injury and Disorders ». *Sub-Cellular Biochemistry* 49: 241-68. doi:10.1007/978-1-4020-8831-5_9.
- Aebersold, Ruedi, et Matthias Mann. 2003. « Mass Spectrometry-Based Proteomics ». *Nature* 422 (6928): 198-207. doi:10.1038/nature01511.
- Aebi, U., R. Bijlenga, J. v d Broek, H. v d Broek, F. Eiserling, C. Kellenberger, E. Kellenberger, et al. 1974. « The Transformation of Tau Particles into T4 Heads. II. Transformations of the Surface Lattice and Related Observations on Form Determination ». *Journal of Supramolecular Structure* 2 (2-4): 253-75. doi:10.1002/jss.400020218.
- Ahn, Seo-Hee, Hee Jung Kim, Imju Jeong, Yi Jae Hong, Myung-Jun Kim, Duck-Joo Rhie, Yang-Hyeok Jo, Sang June Hahn, et Shin Hee Yoon. 2011. « Grape Seed Proanthocyanidin Extract Inhibits Glutamate-Induced Cell Death through Inhibition of Calcium Signals and Nitric Oxide Formation in Cultured Rat Hippocampal Neurons ». *BMC Neuroscience* 12 (août): 78. doi:10.1186/1471-2202-12-78.
- Ainsworth, Elizabeth A., et Kelly M. Gillespie. 2007. « Estimation of Total Phenolic Content and Other Oxidation Substrates in Plant Tissues Using Folin-Ciocalteu Reagent ». *Nature Protocols* 2 (4): 875-77. doi:10.1038/nprot.2007.102.
- Alban, Andrew, Stephen Olu David, Lennart Bjorkestén, Christian Andersson, Erik Sloge, Steve Lewis, et Ian Currie. 2003. « A Novel Experimental Design for Comparative Two-Dimensional Gel Analysis: Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis Incorporating a Pooled Internal Standard ». *Proteomics* 3 (1): 36-44. doi:10.1002/pmic.200390006.
- Alizadeh, Fatemeh, Azam Bolhassani, Afshin Khavari, S. Zahra Bathaie, Tahereh Naji, et Sepideh Arbabi Bidgoli. 2014. « Retinoids and Their Biological Effects against Cancer ». *International Immunopharmacology* 18 (1): 43-49. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.027.
- Allet, Nadia, Nicolas Barrillat, Thierry Baussant, Celia Boiteau, Paolo Botti, Lydie Bougueleret, Nicolas Budin, et al. 2004. « In Vitro and in Silico Processes to Identify Differentially Expressed Proteins ». *Proteomics* 4 (8): 2333-51. doi:10.1002/pmic.200300840.
- Anderson, Cameron, et Berdahl L. Jennifer. 2002. « The Experience of Power: Examining the Effects of Power on Approach and Inhibition Tendencies ». *Journal of Personality and Social Psychology* 83 (6): 1362-77.
- Anderson, N. Leigh, et Norman G. Anderson. 2002. « The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 1 (11): 845-67.
- Arici, Mustafa, Ravinder Chana, Andrew Lewington, Jez Brown, et Nigel John Brunskill. 2003. « Stimulation of Proximal Tubular Cell Apoptosis by Albumin-Bound Fatty Acids Mediated by Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14 (1): 17-27.
- Arthur, J. F., S. J. Matkovich, C. J. Mitchell, T. J. Biden, et E. A. Woodcock. 2001. « Evidence for Selective Coupling of Alpha 1-Adrenergic Receptors to Phospholipase C-Beta 1 in Rat Neonatal Cardiomyocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (40): 37341-46. doi:10.1074/jbc.M106572200.
- Atamer, Aytac, Yuksel Kocyigit, Sabahat A. Eceder, Sahabettin Selek, Nevin Ilhan, Tefvik Eceder, et Yildiz Atamer. 2008. « Effect of Oxidative Stress on Antioxidant Enzyme Activities, Homocysteine and Lipoproteins in Chronic Kidney Disease ». *Journal of Nephrology* 21 (6): 924-30.
- Auger, Donald L., Anjali Dogra Gray, Thomas S. Ream, Akio Kato, Edward H. Cœ, et James A. Birchler. 2005. « Nonadditive Gene Expression in Diploid and Triploid Hybrids of Maize ». *Genetics* 169 (1): 389-97. doi:10.1534/genetics.104.032987.

Awada, Rana, Jean Sébastien Saulnier-Blache, Sandra Grès, Emmanuel Bourdon, Philippe Rondeau, Avinash Parimisetty, Ruben Orihuela, G. Jean Harry, et Christian Lefebvre d'Hellencourt. 2014. « Autotaxin Downregulates LPS-Induced Microglia Activation and pro-Inflammatory Cytokines Production ». *Journal of Cellular Biochemistry* 115 (12): 2123-32. doi:10.1002/jcb.24889.

B

- Bagchi, Debasis, Chandan K. Sen, Sidhartha D. Ray, Dipak K. Das, Manashi Bagchi, Harry G. Preuss, et Joe A. Vinson. 2003. « Molecular Mechanisms of Cardioprotection by a Novel Grape Seed Proanthocyanidin Extract ». *Mutation Research* 523-524 (mars): 87-97.
- Bagchi, M., S. A. Ansari, D. M. Lindenmuth, A. J. van Wijnen, J. Lian, J. L. Stein, et G. S. Stein. 1998. « Nuclear Matrix Associated DNA-Binding Proteins of Ocular Lens Epithelial Cells ». *Molecular Biology Reports* 25 (1): 13-19.
- Balu, Muthaiya, Purushotham Sangeetha, Ganesan Murali, et Chinnakannu Panneerselvam. 2006. « Modulatory Role of Grape Seed Extract on Age-Related Oxidative DNA Damage in Central Nervous System of Rats ». *Brain Research Bulletin* 68 (6): 469-73. doi:10.1016/j.brainresbull.2005.10.007.
- Baur, Joseph A., et David A. Sinclair. 2006. « Therapeutic Potential of Resveratrol: The in Vivo Evidence ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (6): 493-506. doi:10.1038/nrd2060.
- Bays, Harold E. 2004. « Current and Investigational Antiobesity Agents and Obesity Therapeutic Treatment Targets ». *Obesity Research* 12 (8): 1197-1211. doi:10.1038/oby.2004.151.
- Bedard, Karen, Bernard Lardy, et Karl-Heinz Krause. 2007. « NOX Family NADPH Oxidases: Not Just in Mammals ». *Biochimie* 89 (9): 1107-12. doi:10.1016/j.biochi.2007.01.012.
- Berulava, Tea, Matthias Ziehe, Ludger Klein-Hitpass, Emil Mladenov, Jürgen Thomale, Ulrich Rütther, et Bernhard Horsthemke. 2013. « FTO Levels Affect RNA Modification and the Transcriptome ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 21 (3): 317-23. doi:10.1038/ejhg.2012.168.
- Beynon, Robert J., et Julie M. Pratt. 2005. « Metabolic Labeling of Proteins for Proteomics ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 4 (7): 857-72. doi:10.1074/mcp.R400010-MCP200.
- Bhatnagar, D., I. S. Anand, P. N. Durrington, D. J. Patel, G. S. Wander, M. I. Mackness, F. Creed, B. Tomenson, Y. Chandrashekar, et M. Winterbotham. 1995. « Coronary Risk Factors in People from the Indian Subcontinent Living in West London and Their Siblings in India ». *Lancet (London, England)* 345 (8947): 405-9.
- Blackburn, Patricia, Jean-Pierre Després, Benoît Lamarche, Angelo Tremblay, Jean Bergeron, Isabelle Lemieux, et Charles Couillard. 2006. « Postprandial Variations of Plasma Inflammatory Markers in Abdominally Obese Men ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 14 (10): 1747-54. doi:10.1038/oby.2006.201.
- Blessum, C., J. O. Jeppsson, F. Aguzzi, H. Bernon, et J. Bienvenu. 1999. « [Capillary electrophoresis: principles and practice in clinical laboratory] ». *Annales De Biologie Clinique* 57 (6): 643-57.
- Bouchard, C. 2007. « The Biological Predisposition to Obesity: Beyond the Thrifty Genotype Scenario ». *International Journal of Obesity (2005)* 31 (9): 1337-39. doi:10.1038/sj.ijo.0803610.
- Boulland, Jean-Luc, et Line M. Levy. 2005. « [Glutamate, glutamine and ischaemia in the central nervous system] ». *Tidsskrift for Den Norske Lægeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, Ny Række* 125 (11): 1479-81.
- Bralley, Eve E., James L. Hargrove, Phillip Greenspan, et Diane K. Hartle. 2007. « Topical Anti-Inflammatory Activities of Vitis Rotundifolia (Muscadine Grape) Extracts in the Tetradecanoylphorbol Acetate Model of Ear Inflammation ». *Journal of Medicinal Food* 10 (4): 636-42. doi:10.1089/jmf.2006.244.
- Brar, Sukhdev S., Thomas P. Kennedy, Anne B. Sturrock, Thomas P. Huecksteadt, Mark T. Quinn, A. Richard Whorton, et John R. Hoidal. 2002. « An NAD(P)H Oxidase Regulates Growth and

- Transcription in Melanoma Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282 (6): C1212-1224. doi:10.1152/ajpcell.00496.2001.
- Bray, G. A. 1987. « Obesity--a Disease of Nutrient or Energy Balance? » *Nutrition Reviews* 45 (2): 33-43.
- Brown, Carlos V. R., Peter Rhee, Angela L. Neville, Burapat Sangthong, Ali Salim, et Demetrios Demetriades. 2006. « Obesity and Traumatic Brain Injury ». *The Journal of Trauma* 61 (3): 572-76. doi:10.1097/01.ta.0000200842.19740.38.
- Brun, Virginie, Alain Dupuis, Annie Adrait, Marlène Marcellin, Damien Thomas, Magali Court, François Vandenesch, et Jérôme Garin. 2007. « Isotope-Labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 6 (12): 2139-49. doi:10.1074/mcp.M700163-MCP200.
- Bukowska, Alicja, Uwe Lendeckel, Stefanie M. Bode-Böger, et Andreas Goette. 2012. « Physiologic and Pathophysiologic Role of Calpain: Implications for the Occurrence of Atrial Fibrillation ». *Cardiovascular Therapeutics* 30 (3): e115-127. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00245.x.
- Bunger, Maureen K., Benjamin J. Cargile, Anne Ngunjiri, Jonathan L. Bundy, et James L. Stephenson. 2008. « Automated Proteomics of E. Coli via Top-down Electron-Transfer Dissociation Mass Spectrometry ». *Analytical Chemistry* 80 (5): 1459-67. doi:10.1021/ac7018409.
- Burnette, W. N. 1981a. « "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate--Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A ». *Analytical Biochemistry* 112 (2): 195-203.
- . 1981b. « "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate--Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A ». *Analytical Biochemistry* 112 (2): 195-203.

e

- Cano-Ramírez, D., C. E. Torres-Vargas, S. Guerrero-Castillo, S. Uribe-Carvajal, R. Hernández-Pando, J. Pedraza-Chaverri, et M. Orozco-Ibarra. 2012. « Effect of Glycolysis Inhibition on Mitochondrial Function in Rat Brain ». *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 26 (5): 206-11. doi:10.1002/jbt.21404.
- Catterall, W. A. 2000. « Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 521-55. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521.
- Chacón, Matilde R., Victòria Ceperuelo-Mallafre, Elsa Maymó-Masip, Josep Maria Mateo-Sanz, Lluís Arola, Cristina Guitiérrez, José Manuel Fernandez-Real, Ana Ardèvol, Imma Simón, et Joan Vendrell. 2009. « Grape-Seed Procyanidins Modulate Inflammation on Human Differentiated Adipocytes in Vitro ». *Cytokine* 47 (2): 137-42. doi:10.1016/j.cyto.2009.06.001.
- Chacon, Ofelia, Luiz E. Bermudez, Denise K. Zinniel, Harpreet K. Chahal, Robert J. Fenton, Zhengyu Feng, Kathy Hanford, L. Garry Adams, et Raúl G. Barletta. 2009. « Impairment of D-Alanine Biosynthesis in Mycobacterium Smegmatis Determines Decreased Intracellular Survival in Human Macrophages ». *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 5): 1440-50. doi:10.1099/mic.0.024901-0.
- Chakravarti, Bulbul, Pamela Fathy, Michael Sindicich, Buddhadeb Mallik, et Deb N. Chakravarti. 2010. « Comparison of SYPRO Ruby and Flamingo Fluorescent Stains for Application in Proteomic Research ». *Analytical Biochemistry* 398 (1): 1-6. doi:10.1016/j.ab.2009.07.055.
- Charradi, Kamel, Salem Elkahoui, Ines Karkouch, Ferid Limam, Fethy Ben Hassine, et Ezzedine Aouani. 2012. « Grape Seed and Skin Extract Prevents High-Fat Diet-Induced Brain Lipotoxicity in Rat ». *Neurochemical Research* 37 (9): 2004-13. doi:10.1007/s11064-012-0821-2.
- Charradi, Kamel, Hichem Sebai, Salem Elkahoui, Fethy Ben Hassine, Ferid Limam, et Ezzedine Aouani. 2011. « Grape Seed Extract Alleviates High-Fat Diet-Induced Obesity and Heart Dysfunction by Preventing Cardiac Siderosis ». *Cardiovascular Toxicology* 11 (1): 28-37. doi:10.1007/s12012-010-9101-z.

- Chelius, Dirk, et Pavel V. Bondarenko. 2002. « Quantitative Profiling of Proteins in Complex Mixtures Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry ». *Journal of Proteome Research* 1 (4): 317-23.
- Chen, Li, Yue-Shan Piao, Qing-Zhong Xu, Xiao-Ping Yang, Hong Yang, et De-Hong Lu. 2006. « Papillary Glioneuronal Tumor: A Clinicopathological and Immunohistochemical Study of Two Cases ». *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 26 (3): 243-48.
- Chen, Pei-Ni, Shu-Chen Chu, Hui-Ling Chiou, Wu-Hsien Kuo, Chui-Liang Chiang, et Yih-Shou Hsieh. 2006. « Mulberry Anthocyanins, Cyanidin 3-Rutinoside and Cyanidin 3-Glucoside, Exhibited an Inhibitory Effect on the Migration and Invasion of a Human Lung Cancer Cell Line ». *Cancer Letters* 235 (2): 248-59. doi:10.1016/j.canlet.2005.04.033.
- Chen, Yuan-Hao, Yung-Hsiao Chiang, et Hsin-I. Ma. 2014. « Analysis of Spatial and Temporal Protein Expression in the Cerebral Cortex after Ischemia-Reperfusion Injury ». *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)* 10 (2): 84-93. doi:10.3988/jcn.2014.10.2.84.
- Chenau, J., S. Michelland, et M. Seve. 2008. « [Secretome: definitions and biomedical interest] ». *La Revue De Médecine Interne / Fondée ... Par La Société Nationale Française De Médecine Interne* 29 (7): 606-8. doi:10.1016/j.revmed.2007.12.011.
- Christopherson, K. S., et D. S. Bredt. 1997. « Nitric Oxide in Excitable Tissues: Physiological Roles and Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 100 (10): 2424-29. doi:10.1172/JCI119783.
- Clausen, Fredrik. 2012. « Exploring a New Approach to Treating Brain Injury: Anti-Inflammatory Effect of Pulsed Electromagnetic Fields ». *Neuroscience Letters* 519 (1): 1-3. doi:10.1016/j.neulet.2012.04.069.
- Colinge, Jacques, Diego Chiappe, Sophie Lagache, Marc Moniatte, et Lydie Bougueleret. 2005. « Differential Proteomics via Probabilistic Peptide Identification Scores ». *Analytical Chemistry* 77 (2): 596-606. doi:10.1021/ac0488513.
- Colmers, William F. 2006. « What Makes People Fat? View from the Chair ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 14 Suppl 5 (août): 190S-191S. doi:10.1038/oby.2006.306.
- Cotter, R. J. 1992. « Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Biological Molecules ». *Analytical Chemistry* 64 (21): 1027A-1039A.
- Cuadrado-Tejedor, Mar, Marcos Vilariño, Felipe Cabodevilla, Joaquín Del Río, Diana Frechilla, et Alberto Pérez-Mediavilla. 2011. « Enhanced Expression of the Voltage-Dependent Anion Channel 1 (VDAC1) in Alzheimer's Disease Transgenic Mice: An Insight into the Pathogenic Effects of Amyloid- β ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 23 (2): 195-206. doi:10.3233/JAD-2010-100966.
- Czeglédi, B., T. Zsoldos, et G. Mózsik. 1984. « Effect of PGF2 Alpha Administered in Cytoprotective and Antisecretory Doses on the Ethanol- and HCl-Induced Gastric Mucosal Damage and Gastric Mucosal Superoxide Dismutase Activity in Rats ». *Acta Physiologica Hungarica* 64 (3-4): 331-37.

D

- Dalle-Donne, Isabella, Ranieri Rossi, Roberto Colombo, Daniela Giustarini, et Aldo Milzani. 2006. « Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease ». *Clinical Chemistry* 52 (4): 601-23. doi:10.1373/clinchem.2005.061408.
- Danielsen, Pernille Høgh, Steffen Loft, Anette Kocbach, Per E. Schwarze, et Peter Møller. 2009. « Oxidative Damage to DNA and Repair Induced by Norwegian Wood Smoke Particles in Human A549 and THP-1 Cell Lines ». *Mutation Research* 674 (1-2): 116-22. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.10.014.
- Darblade, B., C. Privat, D. Caillaud, J. Rami, et J. F. Arnal. 2000. « [Clinical and biological investigation of NO] ». *Journal De La Société De Biologie* 194 (3-4): 151-57.

- Davies, H. D., D. Robinson, et L. Beville. 1995. « Supportive Group Experience for Patients with Early-Stage Alzheimer's Disease ». *Journal of the American Geriatrics Society* 43 (9): 1068-69.
- Davis, M. T., D. C. Stahl, S. A. Hefta, et T. D. Lee. 1995. « A Microscale Electrospray Interface for On-Line, Capillary Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry of Complex Peptide Mixtures ». *Analytical Chemistry* 67 (24): 4549-56.
- De Luca, F., M. Maghnie, T. Arrigo, F. Lombardo, M. F. Messina, et S. Bernasconi. 1996. « Final Height Outcome of Growth Hormone-Deficient Patients Treated since Less than Five Years of Age ». *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* 85 (10): 1167-71.
- Debette, Stéphanie, Alexa Beiser, Udo Hoffmann, Charles Decarli, Christopher J. O'Donnell, Joseph M. Massaro, Rhoda Au, et al. 2010. « Visceral Fat Is Associated with Lower Brain Volume in Healthy Middle-Aged Adults ». *Annals of Neurology* 68 (2): 136-44. doi:10.1002/ana.22062.
- Décorde, Kelly, Pierre-Louis Teissède, Thibault Sutra, Emilie Ventura, Jean-Paul Cristol, et Jean-Max Rouanet. 2009. « Chardonnay Grape Seed Procyanidin Extract Supplementation Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Hamsters by Improving Adipokine Imbalance and Oxidative Stress Markers ». *Molecular Nutrition & Food Research* 53 (5): 659-66. doi:10.1002/mnfr.200800165.
- DeLeo, F. R., M. A. Jutila, et M. T. Quinn. 1996. « Characterization of Peptide Diffusion into Electroporated Neutrophils ». *Journal of Immunological Methods* 198 (1): 35-49.
- Dell, Jeffrey R., et Kenneth R. O'Kelley. 2005. « PelviSoft BioMesh Augmentation of Rectocele Repair: The Initial Clinical Experience in 35 Patients ». *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction* 16 (1): 44-47; discussion 47. doi:10.1007/s00192-004-1217-x.
- Derbeneva, S. A., A. R. Bogdanov, A. V. Pogozheva, O. A. Gladyshev, L. S. Vasilevskaia, S. N. Zorin, et V. K. Mazo. 2012. « [Effect of diet enriched with selenium on the psycho-emotional and adaptive capacity of patients with cardiovascular diseases and obesity] ». *Voprosy Pitaniia* 81 (4): 35-41.
- Dewanto, Veronica, Xianzhong Wu, Kafui K. Adom, et Rui Hai Liu. 2002. « Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (10): 3010-14.
- Domon, Bruno, et Ruedi Aebersold. 2006a. « Mass Spectrometry and Protein Analysis ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5771): 212-17. doi:10.1126/science.1124619.
- . 2006b. « Challenges and Opportunities in Proteomics Data Analysis ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5 (10): 1921-26. doi:10.1074/mcp.R600012-MCP200.
- Drummond, G. R., H. Cai, M. E. Davis, S. Ramasamy, et D. G. Harrison. 2000. « Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Hydrogen Peroxide ». *Circulation Research* 86 (3): 347-54.
- Ducret, A., I. Van Oostveen, J. K. Eng, J. R. Yates, et R. Aebersold. 1998. « High Throughput Protein Characterization by Automated Reverse-Phase Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 7 (3): 706-19. doi:10.1002/pro.5560070320.
- Dudzinski, David M., Junsuke Igarashi, Daniel Greif, et Thomas Michel. 2006. « The Regulation and Pharmacology of Endothelial Nitric Oxide Synthase ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 46: 235-76. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121844.
- Dulundu, Ender, Yahya Ozel, Umit Topaloglu, Hale Toklu, Feriha Ercan, Nursal Gedik, et Goksel Sener. 2007. « Grape Seed Extract Reduces Oxidative Stress and Fibrosis in Experimental Biliary Obstruction ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22 (6): 885-92. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.04875.x.

e

- Edderkaoui, Mouad, Peggy Hong, Eva C. Vaquero, Jong K. Lee, Lars Fischer, Helmut Friess, Markus W. Buchler, Markus M. Lerch, Stephen J. Pandol, et Anna S. Gukovskaya. 2005. « Extracellular Matrix Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Increases

- Pancreatic Cancer Cell Survival through 5-Lipoxygenase and NADPH Oxidase ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 289 (6): G1137-1147. doi:10.1152/ajpgi.00197.2005.
- Edman, P. 1949. « A Method for the Determination of Amino Acid Sequence in Peptides ». *Archives of Biochemistry* 22 (3): 475.
- El Kadmiri, Nadia, Raquel Cuados, Bouchra El Moutawakil, Ilham Slassi, Jesus Avila, Sellama Nadifi, Ahmed Hachem, et Abdelaziz Soukri. 2014. « A Proteomic Approach for the Involvement of the GAPDH in Alzheimer Disease in the Blood of Moroccan FAD Cases ». *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 54 (4): 774-79. doi:10.1007/s12031-014-0374-8.

F

- Falchi, A., I. S. Piras, G. Vona, J. P. Amoros, C. M. Calo', L. Giovannoni, et L. Varesi. 2007. « Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene Polymorphisms Are Associated with Coronary Artery Disease in Corsican Population (France) ». *Experimental and Molecular Pathology* 83 (1): 25-29. doi:10.1016/j.yexmp.2006.12.007.
- Feijóo, Montserrat, Isaac Túnez, Adela Ruiz, Inmaculada Tasset, Elisa Muñoz, et Eduardo Collantes. 2010. « [Oxidative stress biomarkers as indicator of chronic inflammatory joint diseases stage] ». *Reumatología Clínica* 6 (2): 91-94. doi:10.1016/j.reuma.2008.12.016.
- Fernández-Sánchez, Alba, Eduardo Madrigal-Santillán, Mirandeli Bautista, Jaime Esquivel-Soto, Angel Morales-González, Cesar Esquivel-Chirino, Irene Durante-Montiel, Graciela Sánchez-Rivera, Carmen Valadez-Vega, et José A. Morales-González. 2011. « Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity ». *International Journal of Molecular Sciences* 12 (5): 3117-32. doi:10.3390/ijms12053117.
- Finlay, G. A., V. J. Thannickal, B. L. Fanburg, et K. E. Paulson. 2000. « Transforming Growth Factor-Beta 1-Induced Activation of the ERK Pathway/Activator Protein-1 in Human Lung Fibroblasts Requires the Autocrine Induction of Basic Fibroblast Growth Factor ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 27650-56. doi:10.1074/jbc.M000893200.
- Flirski, Marcin, et Tomasz Sobow. 2005. « Biochemical Markers and Risk Factors of Alzheimer's Disease ». *Current Alzheimer Research* 2 (1): 47-64.
- Folch, J., M. Lees, et G. H. Sloane Stanley. 1957. « A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues ». *The Journal of Biological Chemistry* 226 (1): 497-509.
- Folch, J., et H. Porter. 1957. « Brain Copperprotein Fractions in the Normal and in Wilson's Disease ». *A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry* 77 (1): 8-16.
- Frayling, Timothy M., Nicholas J. Timpson, Michael N. Weedon, Eleftheria Zeggini, Rachel M. Freathy, Cecilia M. Lindgren, John R. B. Perry, et al. 2007. « A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity ». *Science (New York, N.Y.)* 316 (5826): 889-94. doi:10.1126/science.1141634.
- Fridovich, I. 1995. « Superoxide Radical and Superoxide Dismutases ». *Annual Review of Biochemistry* 64: 97-112. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.
- . 1999. « Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen? » *Annals of the New York Academy of Sciences* 893: 13-18.
- Furukawa, Shigetada, Takuya Fujita, Michio Shimabukuro, Masanori Iwaki, Yukio Yamada, Yoshimitsu Nakajima, Osamu Nakayama, Makoto Makishima, Morihiro Matsuda, et Ichiro Shimomura. 2004. « Increased Oxidative Stress in Obesity and Its Impact on Metabolic Syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (12): 1752-61. doi:10.1172/JCI21625.
- Furukawa, Toru, et Akira Horii. 2004. « Molecular Pathology of Pancreatic Cancer: In Quest of Tumor Suppressor Genes ». *Pancreas* 28 (3): 253-56.

G

- Galgani, F., et G. Bocquene. 1990. « In Vitro Inhibition of Acetylcholinesterase from Four Marine Species by Organophosphates and Carbamates ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 45 (2): 243-49.
- Galinier, Anne, Audrey Carrière, Yvette Fernandez, Christian Carpéné, Mireille André, Sylvie Caspar-Bauguil, Jean-Paul Thouvenot, Brigitte Périquet, Luc Pénicaud, et Louis Casteilla. 2006. « Adipose Tissue Proadipogenic Redox Changes in Obesity ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (18): 12682-87. doi:10.1074/jbc.M506949200.
- Gandhi, Gautam K., Nancy F. Cruz, Kelly K. Ball, et Gerald A. Dienel. 2009. « Astrocytes Are Poised for Lactate Trafficking and Release from Activated Brain and for Supply of Glucose to Neurons ». *Journal of Neurochemistry* 111 (2): 522-36. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06333.x.
- Garrel, Ghislaine, Violaine Simon, Chantal Denoyelle, Muhammad Ishaq, Claude Rouch, Julien Dairou, Christophe Magnan, Stéphanie Migrenne, Céline Cruciani-Guglielmacci, et Joëlle Cohen-Tannoudji. 2014. « Unsaturated Fatty Acids Disrupt Smad Signaling in Gonadotrope Cells Leading to Inhibition of FSH β Gene Expression ». *Endocrinology* 155 (2): 592-604. doi:10.1210/en.2013-1833.
- Garrigos, M., J. Belehradek, L. M. Mir, et S. Orłowski. 1993. « Absence of Cooperativity for MgATP and Verapamil Effects on the ATPase Activity of P-Glycoprotein Containing Membrane Vesicles ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196 (3): 1034-41. doi:10.1006/bbrc.1993.2355.
- Geng, Xiaokun, Omar Elmadhoun, Changya Peng, Xunming Ji, Adam Hafeez, Zongjian Liu, Huishan Du, Jose A. Rafols, et Yuchuan Ding. 2015. « Ethanol and Normobaric Oxygen: Novel Approach in Modulating Pyruvate Dehydrogenase Complex after Severe Transient and Permanent Ischemic Stroke ». *Stroke* 46 (2): 492-99. doi:10.1161/STROKEAHA.114.006994.
- George, Trevor W., Saran Waroonphan, Chutamat Niwat, Michael H. Gordon, et Julie A. Lovegrove. 2013. « Effects of Acute Consumption of a Fruit and Vegetable Purée-Based Drink on Vasodilation and Oxidative Status ». *The British Journal of Nutrition* 109 (8): 1442-52. doi:10.1017/S0007114512003315.
- Ghaiad, Heba R., Mohammed M. Nooh, Maha M. El-Sawalhi, et Amira A. Shaheen. 2016. « Resveratrol Promotes Remyelination in Cuprizone Model of Multiple Sclerosis: Biochemical and Histological Study ». *Molecular Neurobiology*, avril. doi:10.1007/s12035-016-9891-5.
- Ghosh, Abhijit, Yuk Yin Cheung, Brian C. Mansfield, et Janice Yang Chou. 2005. « Brain Contains a Functional Glucose-6-Phosphatase Complex Capable of Endogenous Glucose Production ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (12): 11114-19. doi:10.1074/jbc.M410894200.
- Gilbert, D. A., M. Sutherland, et P. M. Kroonenberg. 2000. « Exploring Subject-Related Interactions in Repeated Measures Data Using Three-Mode Principal Components Analysis ». *Nursing Research* 49 (1): 57-61.
- Gonzalez, Sergio, Jade Berthelot, Jennifer Jiner, Claire Perrin-Tricaud, Ruani Fernando, Roman Chrast, Guy Lenaers, et Nicolas Tricaud. 2016. « Blocking Mitochondrial Calcium Release in Schwann Cells Prevents Demyelinating Neuropathies ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (7): 2773. doi:10.1172/JCI88179.
- Greber, S., G. Lubec, N. Cairns, et M. Fountoulakis. 1999. « Decreased Levels of Synaptosomal Associated Protein 25 in the Brain of Patients with Down Syndrome and Alzheimer's Disease ». *Electrophoresis* 20 (4-5): 928-34. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:4/5<928::AID-ELPS928>3.0.CO;2-Z.
- Griendling, K. K., et R. W. Alexander. 1997. « Oxidative Stress and Cardiovascular Disease ». *Circulation* 96 (10): 3264-65.
- Gustafson, D., L. Lissner, C. Bengtsson, C. Björkelund, et I. Skoog. 2004. « A 24-Year Follow-up of Body Mass Index and Cerebral Atrophy ». *Neurology* 63 (10): 1876-81.
- Gustafson, Deborah, Elisabet Rothenberg, Kaj Blennow, Bertil Steen, et Ingmar Skoog. 2003. « An 18-Year Follow-up of Overweight and Risk of Alzheimer Disease ». *Archives of Internal Medicine* 163 (13): 1524-28. doi:10.1001/archinte.163.13.1524.

Gygi, S. P., G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon, et R. Aebersold. 2000. « Evaluation of Two-Dimensional Gel Electrophoresis-Based Proteome Analysis Technology ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17): 9390-95. doi:10.1073/pnas.160270797.

Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza, et R. Aebersold. 1999. « Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (3): 1720-30.

H

Haltia, Lauri T., Antti Viljanen, Riitta Parkkola, Nina Kemppainen, Juha O. Rinne, Pirjo Nuutila, et Valtteri Kaasinen. 2007. « Brain White Matter Expansion in Human Obesity and the Recovering Effect of Dieting ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (8): 3278-84. doi:10.1210/jc.2006-2495.

Hamano, Tadanori, Tania F Gendron, Li-Wen Ko, et Shu-Hui Yen. 2009. « Concentration-Dependent Effects of Proteasomal Inhibition on Tau Processing in a Cellular Model of Tauopathy ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2 (6): 561-73.

Hamlaoui-Gasmi, Sonia, Meherzia Mokni, Nadia Limam, Prudence N'guessan, Alice Carrier, Ferid Limam, Mohamed Amri, Ezzedine Aouani, et Lamjed Marzouki. 2012. « Grape Seed and Skin Extract Mitigates Garlic-Induced Oxidative Stress in Rat Liver ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 90 (5): 547-56. doi:10.1139/y2012-025.

Hasegawa, Takafumi. 2010. « Tyrosinase-Expressing Neuronal Cell Line as in Vitro Model of Parkinson's Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 11 (3): 1082-89. doi:10.3390/ijms11031082.

Headlam, Henrietta A., et Michael J. Davies. 2003. « Cell-Mediated Reduction of Protein and Peptide Hydroperoxides to Reactive Free Radicals ». *Free Radical Biology & Medicine* 34 (1): 44-55.

Higashi, Masahiro, et Donald G. Truhlar. 2009. « Efficient Approach to Reactive Molecular Dynamics with Accurate Forces ». *Journal of Chemical Theory and Computation* 5 (11): 2925-29. doi:10.1021/ct900301d.

Higashi, Yukihito, Chikara Goto, Takayuki Hidaka, Junko Soga, Shuji Nakamura, Yuichi Fujii, Takaki Hata, et al. 2009. « Oral Infection-Inflammatory Pathway, Periodontitis, Is a Risk Factor for Endothelial Dysfunction in Patients with Coronary Artery Disease ». *Atherosclerosis* 206 (2): 604-10. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.037.

Ho, April J., Jason L. Stein, Xue Hua, Suh Lee, Derrek P. Hibar, Alex D. Leow, Ivo D. Dinov, et al. 2010. « A Commonly Carried Allele of the Obesity-Related FTO Gene Is Associated with Reduced Brain Volume in the Healthy Elderly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (18): 8404-9. doi:10.1073/pnas.0910878107.

Ho, Daniel J., Noel Y. Calingasan, Elizabeth Wille, Magali Dumont, et M. Flint Beal. 2010. « Resveratrol Protects against Peripheral Deficits in a Mouse Model of Huntington's Disease ». *Experimental Neurology* 225 (1): 74-84. doi:10.1016/j.expneurol.2010.05.006.

Hörth, Patric, Christine A. Miller, Tobias Preckel, et Christian Wenz. 2006. « Efficient Fractionation and Improved Protein Identification by Peptide OFFGEL Electrophoresis ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5 (10): 1968-74. doi:10.1074/mcp.T600037-MCP200.

Hubert, H. B., M. Feinleib, P. M. McNamara, et W. P. Castelli. 1983. « Obesity as an Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease: A 26-Year Follow-up of Participants in the Framingham Heart Study ». *Circulation* 67 (5): 968-77.

Hudson, Michael E., Irina Pozdnyakova, Kenneth Haines, Gil Mor, et Michael Snyder. 2007. « Identification of Differentially Expressed Proteins in Ovarian Cancer Using High-Density Protein Microarrays ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (44): 17494-99. doi:10.1073/pnas.0708572104.

Hudson, Tamaro S., Diane K. Hartle, Stephen D. Hursting, Nomeli P. Nunez, Thomas T. Y. Wang, Heather A. Young, Praveen Arany, et Jeffrey E. Green. 2007. « Inhibition of Prostate Cancer Growth by Muscadine Grape Skin Extract and Resveratrol through Distinct Mechanisms ». *Cancer Research* 67 (17): 8396-8405. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4069.

- Hughes, Michael J., Michael Gerken, Hélène P. A. Mercier, et Gary J. Schrobilgen. 2010. « Syntheses and Multi-NMR Study of Fac- and Mer-OsO(3)F(2)(NCCH(3)) and the X-Ray Crystal Structure (n = 2) and Raman Spectrum (n = 0) of Fac-OsO(3)F(2)(NCCH(3)).NCH(3)CN ». *Inorganic Chemistry* 49 (11): 4768-80. doi:10.1021/ic100383p.
- Humbert, G., M. F. Guingamp, et G. Linden. 1997. « Method for the Measurement of Lipase Activity in Milk ». *The Journal of Dairy Research* 64 (3): 465-69.
- Hwang, I. K., V. L. W. Go, D. M. Harris, I. Yip, K. W. Kang, et M. K. Song. 2003. « Effects of Cyclo (His-pro) plus Zinc on Glucose Metabolism in Genetically Diabetic Obese Mice ». *Diabetes, Obesity & Metabolism* 5 (5): 317-24.

J

- Jain, Anshu, Govinder J. S. Flora, Rakesh Bhargava, et S. J. S. Flora. 2012. « Influence of Age on Arsenic-Induced Oxidative Stress in Rat ». *Biological Trace Element Research* 149 (3): 382-90. doi:10.1007/s12011-012-9432-7.
- Jenkins, Rosalind E., Neil R. Kitteringham, Christie L. Hunter, Sally Webb, Tony J. Hunt, Robert Elsby, Rod B. Watson, Dominic Williams, Stephen R. Pennington, et B. Kevin Park. 2006. « Relative and Absolute Quantitative Expression Profiling of Cytochromes P450 Using Isotope-Coded Affinity Tags ». *Proteomics* 6 (6): 1934-47. doi:10.1002/pmic.200500432.
- Jia, Guifang, Ye Fu, Xu Zhao, Qing Dai, Guanqun Zheng, Ying Yang, Chengqi Yi, et al. 2011. « N6-Methyladenosine in Nuclear RNA Is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO ». *Nature Chemical Biology* 7 (12): 885-87. doi:10.1038/nchembio.687.
- Jia, Guifang, Cai-Guang Yang, Shangdong Yang, Xing Jian, Chengqi Yi, Zhiqiang Zhou, et Chuan He. 2008. « Oxidative Demethylation of 3-Methylthymine and 3-Methyluracil in Single-Stranded DNA and RNA by Mouse and Human FTO ». *FEBS Letters* 582 (23-24): 3313-19. doi:10.1016/j.febslet.2008.08.019.
- Jiang, Yan J., Yoshikazu Uchida, Biao Lu, Peggy Kim, Cungui Mao, Masashi Akiyama, Peter M. Elias, Walter M. Holleran, Carl Grunfeld, et Kenneth R. Feingold. 2009. « Ceramide Stimulates ABCA12 Expression via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {delta} in Human Keratinocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (28): 18942-52. doi:10.1074/jbc.M109.006973.
- Jorgenson, J. W., et K. D. Lukacs. 1981. « Free-Zone Electrophoresis in Glass Capillaries ». *Clinical Chemistry* 27 (9): 1551-53.
- Jung, Ji Wook, Nam Yoon Ahn, Hye Rim Oh, Bo Kyung Lee, Kang Jin Lee, Sun Yeou Kim, Jae Hoon Cheong, et Jong Hoon Ryu. 2006. « Anxiolytic Effects of the Aqueous Extract of Uncaria Rhynchophylla ». *Journal of Ethnopharmacology* 108 (2): 193- 97. doi:10.1016/j.jep.2006.05.019.

K

- Kakkar, P., B. Das, et P. N. Viswanathan. 1984. « A Modified Spectrophotometric Assay of Superoxide Dismutase ». *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 21 (2): 130- 32.
- Kalmijn, S. 2000. « Fatty Acid Intake and the Risk of Dementia and Cognitive Decline: A Review of Clinical and Epidemiological Studies ». *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 4 (4): 202- 7.
- Kamijo, Yuji, Yoko Kaneko, Toru Ichikawa, Nobuhiko Kobayashi, Takayuki Koyama, Tetsuji Kakegawa, Hiroshi Kamijo, et al. 2002. « A Case of Nephrotic Syndrome Due to Lupus Nephritis Which Was Controlled with Low-Density Lipoprotein Apheresis ». *Therapeutic Apheresis: Official Journal of the International Society for Apheresis and the Japanese Society for Apheresis* 6 (6): 459- 62.
- Kelleher, D. K., et C. Duggan. 1999. « Breast Milk and Breastfeeding in the 1990s ». *Current Opinion in Pediatrics* 11 (3): 275- 80.
- Kitamura, S., S. Kondo, Y. Shinomura, K. Isozaki, S. Kanayama, Y. Higashimoto, T. Minami, et al. 2000. « Expression of Hepatocyte Growth Factor and C-Met in Ulcerative Colitis ».

- Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 49 (7): 320- 24. doi:10.1007/PL00000212.
- Kocic, G., G. Bjelakovic, Lj Saranac, R. Kocic, T. Jevtovic, D. Sokolovic, G. Nikolic, D. Pavlovic, et S. Stojanovic. 2008. « Altered Degradation of Circulating Nucleic Acids and Oligonucleotides in Diabetic Patients ». *Diabetes Research and Clinical Practice* 79 (2): 204- 13. doi:10.1016/j.diabres.2007.08.027.
- Kopelman, P. G. 2000. « Physiopathology of Prolactin Secretion in Obesity ». *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 24 Suppl 2 (juin): S104-108.
- Kostyuk, P., et A. Verkhratsky. 1994. « Calcium Stores in Neurons and Glia ». *Neuroscience* 63 (2): 381- 404.
- Kurth, Tobias, J. Michael Gaziano, Klaus Berger, Carlos S. Kase, Kathryn M. Rexrode, Nancy R. Cook, Julie E. Buring, et JoAnn E. Manson. 2002. « Body Mass Index and the Risk of Stroke in Men ». *Archives of Internal Medicine* 162 (22): 2557- 62.
- L**
- Laschet, Jacques J., Frédéric Minier, Irène Kurcewicz, Michel H. Bureau, Suzanne Trottier, Freddy Jeanneteau, Nathalie Griffon, et al. 2004. « Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is a GABAA Receptor Kinase Linking Glycolysis to Neuronal Inhibition ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (35): 7614- 22. doi:10.1523/JNEUROSCI.0868-04.2004.
- Lazzè, Maria Claudia, Roberto Pizzala, Francisco Javier Gutiérrez Pecharrómán, Paloma Gatón Garnica, Juan Manuel Antolín Rodríguez, Nicola Fabris, et Livia Bianchi. 2009. « Grape Waste Extract Obtained by Supercritical Fluid Extraction Contains Bioactive Antioxidant Molecules and Induces Antiproliferative Effects in Human Colon Adenocarcinoma Cells ». *Journal of Medicinal Food* 12 (3): 561- 68. doi:10.1089/jmf.2008.0150.
- Leduc, Valérie, Stéphanie Jasmin-Bélanger, et Judes Poirier. 2010. « APOE and Cholesterol Homeostasis in Alzheimer's Disease ». *Trends in Molecular Medicine* 16 (10): 469- 77. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.008.
- Lee, In-Kyu. 2014. « The Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase in Diabetes and Obesity ». *Diabetes & Metabolism Journal* 38 (3): 181- 86. doi:10.4093/dmj.2014.38.3.181.
- Lefebvre, Bruno, Yacir Benomar, Aurore Guédin, Audrey Langlois, Nathalie Hennuyer, Julie Dumont, Emmanuel Bouchaert, et al. 2010. « Proteasomal Degradation of Retinoid X Receptor Alpha Reprograms Transcriptional Activity of PPARgamma in Obese Mice and Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (5): 1454- 68. doi:10.1172/JCI38606.
- Ley, Ruth E. 2010. « Obesity and the Human Microbiome ». *Current Opinion in Gastroenterology* 26 (1): 5- 11. doi:10.1097/MOG.0b013e328333d751.
- Li, W. G., X. Y. Zhang, Y. J. Wu, et X. Tian. 2001. « Anti-Inflammatory Effect and Mechanism of Proanthocyanidins from Grape Seeds ». *Acta Pharmacologica Sinica* 22 (12): 1117- 20.
- Liao, Zhangping, Dan Liu, Lei Tang, Dong Yin, Shuhua Yin, Songqing Lai, Jianguo Yao, et Ming He. 2015. « Long-Term Oral Resveratrol Intake Provides Nutritional Preconditioning against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Involvement of VDAC1 Downregulation ». *Molecular Nutrition & Food Research* 59 (3): 454- 64. doi:10.1002/mnfr.201400730.
- Link, K. H., M. Kornmann, A. Formentini, G. Leder, E. Sunelaitis, M. Schatz, J. Pressmar, et H. G. Beger. 1999. « Regional Chemotherapy of Non-Resectable Liver Metastases from Colorectal Cancer - Literature and Institutional Review ». *Langenbeck's Archives of Surgery / Deutsche Gesellschaft Für Chirurgie* 384 (4): 344- 53.
- Listenberger, Laura L., Xianlin Han, Sarah E. Lewis, Sylvaine Cases, Robert V. Farese, Daniel S. Ory, et Jean E. Schaffer. 2003. « Triglyceride Accumulation Protects against Fatty Acid-Induced Lipotoxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (6): 3077- 82. doi:10.1073/pnas.0630588100.
- Liu, Hongbin, Rovshan G. Sadygov, et John R. Yates. 2004. « A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics ». *Analytical Chemistry* 76 (14): 4193- 4201. doi:10.1021/ac0498563.

Liu, Xiao-nan, Ting-ting Huo, et Wei-zhong Wang. 2006. « [Protective effect of shenfu injection against ischemia-reperfusion injury due to pancreas transplantation in rats] ». *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi = Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine* 26 Suppl (juin): 111- 15.

M

- Makarov, null. 2000. « Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis ». *Analytical Chemistry* 72 (6): 1156- 62.
- Mallick, Parag, Markus Schirle, Sharon S. Chen, Mark R. Flory, Hookeun Lee, Daniel Martin, Jeffrey Ranish, et al. 2007. « Computational Prediction of Proteotypic Peptides for Quantitative Proteomics ». *Nature Biotechnology* 25 (1): 125- 31. doi:10.1038/nbt1275.
- Marín, J., et M. A. Rodríguez-Martínez. 1997. « Role of Vascular Nitric Oxide in Physiological and Pathological Conditions ». *Pharmacology & Therapeutics* 75 (2): 111- 34.
- Martel, Cecile, Maya Allouche, Davide Degli Esposti, Elena Fanelli, Céline Boursier, Céline Henry, Joel Chopineau, et al. 2013. « Glycogen Synthase Kinase 3-Mediated Voltage-Dependent Anion Channel Phosphorylation Controls Outer Mitochondrial Membrane Permeability during Lipid Accumulation ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57 (1): 93- 102. doi:10.1002/hep.25967.
- Mates, M., et C. H. Kirkpatrick. 1999. « A Man with Multiple Infections with Unusual Organisms ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 82 (1): 17- 22. doi:10.1016/S1081-1206(10)62654-3.
- Matsumura, K., S. Wakatsuki, A. Iwasaki, R. Endo, et K. Tanaka. 1988. « A Rapid Microassay for Detecting Hepatitis B Surface Antigen by Dot Enzyme Immunoassay ». *FEMS Microbiology Immunology* 1 (2): 81- 85.
- Mattevi, V. S., V. M. Zembruski, et M. H. Hutz. 2007. « Effects of a PPAR γ Gene Variant on Obesity Characteristics in Brazil ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 40 (7): 927- 32.
- McAinch, A. J., L. M. Cornall, R. Watts, D. H. Hryciw, P. E. O'Brien, et D. Cameron-Smith. 2015. « Increased Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression in Cultured Myotubes from Obese and Diabetic Individuals ». *European Journal of Nutrition* 54 (7): 1033- 43. doi:10.1007/s00394-014-0780-2.
- McCord, J. M., et I. Fridovich. 1969. « The Utility of Superoxide Dismutase in Studying Free Radical Reactions. I. Radicals Generated by the Interaction of Sulfite, Dimethyl Sulfoxide, and Oxygen ». *The Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6056- 63.
- Mendoza, L. G., P. McQuary, A. Mongan, R. Gangadharan, S. Brignac, et M. Eggers. 1999. « High-Throughput Microarray-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ». *BioTechniques* 27 (4): 778- 80, 782- 86, 788.
- Meyer, C., D. Robson, N. Rackovsky, V. Nadkarni, et J. Gerich. 1997. « Role of the Kidney in Human Leptin Metabolism ». *The American Journal of Physiology* 273 (5 Pt 1): E903-907.
- Mezzetti, A., C. Di Ilio, A. M. Calafiore, A. Aceto, L. Marzio, G. Frederici, et F. Cuccurullo. 1990. « Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase and Glutathione Transferase Activities in the Human Artery, Vein and Heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 22 (9): 935- 38.
- Miller, S. C., B. M. Bowman, M. A. Miller, et C. M. Bagi. 1991. « Calcium Absorption and Osseous Organ-, Tissue-, and Envelope-Specific Changes Following Ovariectomy in Rats ». *Bone* 12 (6): 439- 46.
- Minassian, C., S. Montano, et G. Mithieux. 1999. « Regulatory Role of Glucose-6 Phosphatase in the Repletion of Liver Glycogen during Refeeding in Fasted Rats ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1452 (2): 172- 78.
- Moller, Mary D., et Michael J. Rice. 2006. « The BE SMART Trauma Reframing Psychoeducation Program ». *Archives of Psychiatric Nursing* 20 (1): 21- 31. doi:10.1016/j.apnu.2005.08.007.
- Molteni, R., R. J. Barnard, Z. Ying, C. K. Roberts, et F. Gómez-Pinilla. 2002. « A High-Fat, Refined Sugar Diet Reduces Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neuronal Plasticity, and Learning ». *Neuroscience* 112 (4): 803- 14.

- Mueller, Lukas N., Oliver Rinner, Alexander Schmidt, Simon Letarte, Bernd Bodenmiller, Mi-Youn Brusniak, Olga Vitek, Ruedi Aebersold, et Markus Müller. 2007. « SuperHirn - a Novel Tool for High Resolution LC-MS-Based Peptide/Protein Profiling ». *Proteomics* 7 (19): 3470- 80. doi:10.1002/pmic.200700057.
- Mylonis, Ilias, Hiroshi Sembongi, Christina Befani, Panagiotis Liakos, Symeon Siniossoglou, et George Simos. 2012. « Hypoxia Causes Triglyceride Accumulation by HIF-1-Mediated Stimulation of Lipin 1 Expression ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 14): 3485- 93. doi:10.1242/jcs.106682.

N

- Neri, Eugenio, Lucio Barabesi, Dimitrios Buklas, Luca A. Vricella, Antonio Benvenuti, Enrico Tucci, Carlo Sassi, et Massimo Massetti. 2005. « Limited Role of Aortic Size in the Genesis of Acute Type A Aortic Dissection ». *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 28 (6): 857- 63. doi:10.1016/j.ejcts.2005.10.013.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, et W. Ehrhardt. 1988. « Improved Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels Including Isoelectric Focusing Gels with Clear Background at Nanogram Sensitivity Using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250 ». *Electrophoresis* 9 (6): 255- 62. doi:10.1002/elps.1150090603.
- Nguyen, Jason C. D., A. Simon Killcross, et Trisha A. Jenkins. 2014. « Obesity and Cognitive Decline: Role of Inflammation and Vascular Changes ». *Frontiers in Neuroscience* 8: 375. doi:10.3389/fnins.2014.00375.
- Nihei, T., Y. Miura, et K. Yagasaki. 2001. « Inhibitory Effect of Resveratrol on Proteinuria, Hypoalbuminemia and Hyperlipidemia in Nephritic Rats ». *Life Sciences* 68 (25): 2845- 52.
- Ning, Feng, Lei Zhang, Jacqueline M. Dekker, Altan Onat, Coen D. A. Stehouwer, John S. Yudkin, Tiina Laatikainen, et al. 2012. « Development of Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke in Relation to Fasting and 2-Hour Plasma Glucose Levels in the Normal Range ». *Cardiovascular Diabetology* 11: 76. doi:10.1186/1475-2840-11-76.

O

- « Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation ». 2000. *World Health Organization Technical Report Series* 894: i- xii, 1-253.
- Odelola, H. A., et J. Koza. 1975. « Characterization of Nigerian Strains of West Nile Virus by Plaque Formation ». *Acta Virologica* 19 (6): 489- 92.
- Olas, B., B. Wachowicz, P. Nowak, M. Kedzierska, A. Tomczak, A. Stochmal, W. Oleszek, A. Jezierski, et J. Piekarski. 2008. « Studies on Antioxidant Properties of Polyphenol-Rich Extract from Berries of Aronia Melanocarpa in Blood Platelets ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 59 (4): 823- 35.
- Ong, Shao-En, et Matthias Mann. 2005. « Mass Spectrometry-Based Proteomics Turns Quantitative ». *Nature Chemical Biology* 1 (5): 252- 62. doi:10.1038/nchembio736.
- Onyema, Oscar Okwudiri, Ebenezer Olatunde Farombi, Godwin O. Emerole, Agwu Igwe Ukoha, et Godfrey Okeke Onyeze. 2006. « Effect of Vitamin E on Monosodium Glutamate Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Rats ». *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 43 (1): 20- 24.

P

- Paclat, M. H., A. W. Coleman, S. Vergnaud, et F. Morel. 2000. « P67-Phox-Mediated NADPH Oxidase Assembly: Imaging of Cytochrome B558 Liposomes by Atomic Force Microscopy ». *Biochemistry* 39 (31): 9302- 10.
- Pang, Yuxin, Dan Wang, Zuowang Fan, Xiaolu Chen, Fulai Yu, Xuan Hu, Kai Wang, et Lei Yuan. 2014. « Blumea Balsamifera--a Phytochemical and Pharmacological Review ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 19 (7): 9453- 77. doi:10.3390/molecules19079453.

- Pannacciulli, Nicola, Angelo Del Parigi, Kewei Chen, Duc Son N. T. Le, Eric M. Reiman, et Pietro A. Tataranni. 2006. « Brain Abnormalities in Human Obesity: A Voxel-Based Morphometric Study ». *NeuroImage* 31 (4): 1419- 25. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.01.047.
- Pastrana-Bonilla, Eduardo, Casimir C. Akoh, Subramani Sellappan, et Gerard Krewer. 2003. « Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Muscadine Grapes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (18): 5497- 5503. doi:10.1021/jf030113c.
- Patel, Vibhuti J., Konstantinos Thalassinou, Susan E. Slade, Joanne B. Connolly, Andrew Crombie, J. Colin Murrell, et James H. Scrivens. 2009. « A Comparison of Labeling and Label-Free Mass Spectrometry-Based Proteomics Approaches ». *Journal of Proteome Research* 8 (7): 3752- 59. doi:10.1021/pr900080y.
- Peppas, Dimitra, Upkar S. Gill, Gary Reynolds, Nicholas J. W. Easom, Laura J. Pallett, Anna Schurich, Lorenzo Micco, et al. 2013. « Up-Regulation of a Death Receptor Renders Antiviral T Cells Susceptible to NK Cell-Mediated Deletion ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (1): 99- 114. doi:10.1084/jem.20121172.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy, et J. S. Cottrell. 1999. « Probability-Based Protein Identification by Searching Sequence Databases Using Mass Spectrometry Data ». *Electrophoresis* 20 (18): 3551- 67. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.
- Petersen, Ole H., Marek Michalak, et Alexei Verkhratsky. 2005. « Calcium Signalling: Past, Present and Future ». *Cell Calcium* 38 (3- 4): 161- 69. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.023.
- Pierce, Brandon L., Tara Kalra, Maria Argos, Faruque Parvez, Yu Chen, Tariqul Islam, Alauddin Ahmed, et al. 2010. « A Prospective Study of Body Mass Index and Mortality in Bangladesh ». *International Journal of Epidemiology* 39 (4): 1037- 45. doi:10.1093/ije/dyp364.
- Pietta, P., P. Simonetti, C. Gardana, A. Brusamolino, P. Morazzoni, et E. Bombardelli. 1998. « Relationship between Rate and Extent of Catechin Absorption and Plasma Antioxidant Status ». *Biochemistry and Molecular Biology International* 46 (5): 895- 903.
- Pinelo, Manuel, Monica Rubilar, María Jerez, Jorge Sineiro, et María José Núñez. 2005. « Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (6): 2111- 17. doi:10.1021/jf0488110.
- Polidori, M. Cristina, Domenico Praticó, Francesca Mangialasche, Elena Mariani, Olivier Aust, Timur Anlasik, Ni Mang, et al. 2009. « High Fruit and Vegetable Intake Is Positively Correlated with Antioxidant Status and Cognitive Performance in Healthy Subjects ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 17 (4): 921- 27. doi:10.3233/JAD-2009-1114.
- Polk, Susan L. 2005. « Definitions and Demographics of Obesity: Diagnosis and Risk Factors ». *Anesthesiology Clinics of North America* 23 (3): 397- 403, v. doi:10.1016/j.atc.2005.03.005.
- Postic, C., et J. Girard. 2008. « The Role of the Lipogenic Pathway in the Development of Hepatic Steatosis ». *Diabetes & Metabolism* 34 (6 Pt 2): 643- 48. doi:10.1016/S1262-3636(08)74599-3.
- Pratt, Julie M., Deborah M. Simpson, Mary K. Doherty, Jenny Rivers, Simon J. Gaskell, et Robert J. Beynon. 2006. « Multiplexed Absolute Quantification for Proteomics Using Concatenated Signature Peptides Encoded by QconCAT Genes ». *Nature Protocols* 1 (2): 1029- 43. doi:10.1038/nprot.2006.129.
- Pulinilkunnil, Thomas, Petra C. Kienesberger, Jeevan Nagendran, Terri J. Waller, Martin E. Young, Erin E. Kershaw, Gregory Korbitt, Guenter Haemmerle, Rudolf Zechner, et Jason R. B. Dyck. 2013. « Myocardial Adipose Triglyceride Lipase Overexpression Protects Diabetic Mice from the Development of Lipotoxic Cardiomyopathy ». *Diabetes* 62 (5): 1464- 77. doi:10.2337/db12-0927.

Q

- Qin, Liya, Xuefei Wu, Michelle L. Block, Yuxin Liu, George R. Breese, Jau-Shyong Hong, Darin J. Knapp, et Fulton T. Crews. 2007. « Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration ». *Glia* 55 (5): 453- 62. doi:10.1002/glia.20467.

- Qin, Xia, Bingshi T. Guo, Bing Wan, Lei Fang, Limin Lu, Lili Wu, Ying Qin Zang, et Jingwu Z. Zhang. 2010a. « Regulation of Th1 and Th17 Cell Differentiation and Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Natural Product Compound Berberine ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (3): 1855- 63. doi:10.4049/jimmunol.0903853.
- . 2010b. « Regulation of Th1 and Th17 Cell Differentiation and Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Natural Product Compound Berberine ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (3): 1855- 63. doi:10.4049/jimmunol.0903853.
- Qvit, Nir, Amit U. Joshi, Anna D. Cunningham, Julio C. B. Ferreira, et Daria Mochly-Rosen. 2016. « Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Protein-Protein Interaction Inhibitor Reveals a Non-Catalytic Role for GAPDH Oligomerization in Cell Death ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (26): 13608- 21. doi:10.1074/jbc.M115.711630.

R

- Rabilloud, T. 1990. « Mechanisms of Protein Silver Staining in Polyacrylamide Gels: A 10-Year Synthesis ». *Electrophoresis* 11 (10): 785- 94. doi:10.1002/elps.1150111003.
- Raghavan, Adithya, Tatiana Sheiko, Brett H. Graham, et William J. Craigen. 2012. « Voltage-Dependant Anion Channels: Novel Insights into Isoform Function through Genetic Models ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1818 (6): 1477- 85. doi:10.1016/j.bbamem.2011.10.019.
- Ray, S., et P. Chakrabarti. 1999. « Altered Lipid Peroxidation and Antioxidant Potential in Human Uterine Tumors ». *Indian Journal of Experimental Biology* 37 (5): 439- 43.
- Refsgaard, H. H., L. Tsai, et E. R. Stadtman. 2000. « Modifications of Proteins by Polyunsaturated Fatty Acid Peroxidation Products ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2): 611- 16.
- Rexrode, K. M., C. H. Hennekens, W. C. Willett, G. A. Colditz, M. J. Stampfer, J. W. Rich-Edwards, F. E. Speizer, et J. E. Manson. 1997. « A Prospective Study of Body Mass Index, Weight Change, and Risk of Stroke in Women ». *JAMA* 277 (19): 1539- 45.
- Rezaie, Ali, Robyn D. Parker, et Mohammad Abdollahi. 2007. « Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? ». *Digestive Diseases and Sciences* 52 (9): 2015- 21. doi:10.1007/s10620-006-9622-2.
- Rhee, John M., Michael Schaufele, et William A. Abdu. 2006. « Radiculopathy and the Herniated Lumbar Disc. Controversies Regarding Pathophysiology and Management ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 88 (9): 2070- 80.
- Richmond, Scott R., Michael J. Carper, Xiaoyong Lei, Sheng Zhang, Kevin E. Yarasheski, et Sasanka Ramanadham. 2010. « HIV-Protease Inhibitors Suppress Skeletal Muscle Fatty Acid Oxidation by Reducing CD36 and CPT1 Fatty Acid Transporters ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1801 (5): 559- 66. doi:10.1016/j.bbali.2010.01.007.
- Rifai, Nader, Michael A. Gillette, et Steven A. Carr. 2006. « Protein Biomarker Discovery and Validation: The Long and Uncertain Path to Clinical Utility ». *Nature Biotechnology* 24 (8): 971- 83. doi:10.1038/nbt1235.
- Righetti, P. G. 1989. « Isoelectric Focusing in Immobilized PH Gradients in Studies of Biochemical Polymorphism ». *Animal Genetics* 20 (3): 343- 45.
- Righetti, P. G., et A. Bossi. 1997. « Isoelectric Focusing in Immobilized PH Gradients: An Update ». *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 699 (1- 2): 77- 89.
- Roche, Régis, Laurence Hoareau, Frédéric Mounet, et Franck Festy. 2007. « Adult Stem Cells for Cardiovascular Diseases: The Adipose Tissue Potential ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 7 (6): 791- 98. doi:10.1517/14712598.7.6.791.

S

- Safwen, Kadri, Smine Selima, Elayed Mohamed, Limam Ferid, Cosette Pascal, Amri Mohamed, Aouani Ezzedine, et Mokni Meherzia. 2015. « Protective Effect of Grape Seed and Skin Extract on Cerebral Ischemia in Rat: Implication of Transition Metals ». *International Journal*

- of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society* 10 (3): 415- 24. doi:10.1111/ij.s.12391.
- Saltiel, A. R. 2000. « Series Introduction: The Molecular and Physiological Basis of Insulin Resistance: Emerging Implications for Metabolic and Cardiovascular Diseases ». *The Journal of Clinical Investigation* 106 (2): 163- 64. doi:10.1172/JCI10533.
- Sanchez, Jean-Charles, Véronique Converset, Anna Nolan, Gerhard Schmid, Steven Wang, Manfred Heller, Matthew V. Sennitt, Denis F. Hochstrasser, et Michael A. Cawthorne. 2003. « Effect of Rosiglitazone on the Differential Expression of Obesity and Insulin Resistance Associated Proteins in Lep/Lep Mice ». *Proteomics* 3 (8): 1500- 1520. doi:10.1002/pmic.200300484.
- Sato, K., H. Saito, et N. Matsuki. 1996. « HSP70 Is Essential to the Neuroprotective Effect of Heat-Shock ». *Brain Research* 740 (1- 2): 117- 23.
- Scaps, P., S. Demuynck, M. Descamps, et A. Dhainaut. 1997. « Effects of Organophosphate and Carbamate Pesticides on Acetylcholinesterase and Choline Acetyltransferase Activities of the Polychaete *Nereis Diversicolor* ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 33 (2): 203- 8.
- Scheele, G. A. 1975. « Two-Dimensional Gel Analysis of Soluble Proteins. Characterization of Guinea Pig Exocrine Pancreatic Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 250 (14): 5375- 85.
- Shanmuganayagam, Dhanansayan, Thomas F. Warner, Christian G. Krueger, Jess D. Reed, et John D. Folts. 2007. « Concord Grape Juice Attenuates Platelet Aggregation, Serum Cholesterol and Development of Atheroma in Hypercholesterolemic Rabbits ». *Atherosclerosis* 190 (1): 135- 42. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.03.017.
- Shaw, Joanne, Rachel Rowlinson, Janice Nickson, Tim Stone, Alison Sweet, Karen Williams, et Robert Tonge. 2003. « Evaluation of Saturation Labelling Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis Fluorescent Dyes ». *Proteomics* 3 (7): 1181- 95. doi:10.1002/pmic.200300439.
- Shen, Qiu-Dan, Wei Xu, Hui Yu, Li Li, Su-Jiang Zhang, et Jian-Yong Li. 2007. « [Prognostic significance of lactate dehydrogenase and beta2-microglobulin in chronic lymphocytic leukemia] ». *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 15 (6): 1305- 8.
- Sherman, Matthew, Ming-Mei Liu, Shari Birnbaum, Steven E. Wolf, Joseph P. Minei, et Joshua W. Gatson. 2016. « Adult Obese Mice Suffer from Chronic Secondary Brain Injury after Mild TBI ». *Journal of Neuroinflammation* 13 (1): 171. doi:10.1186/s12974-016-0641-4.
- Shimoi, K., B. Shen, S. Toyokuni, R. Mochizuki, M. Furugori, et N. Kinae. 1997. « Protection by Alpha G-Rutin, a Water-Soluble Antioxidant Flavonoid, against Renal Damage in Mice Treated with Ferric Nitrilotriacetate ». *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 88 (5): 453- 60.
- Shrewsbury, Vanessa, et Jane Wardle. 2008. « Socioeconomic Status and Adiposity in Childhood: A Systematic Review of Cross-Sectional Studies 1990-2005 ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 16 (2): 275- 84. doi:10.1038/oby.2007.35.
- Shulman, G. I. 2000. « Cellular Mechanisms of Insulin Resistance ». *The Journal of Clinical Investigation* 106 (2): 171- 76. doi:10.1172/JCI10583.
- Shulman, Stanford T. 2006. « Obesity: A Real Epidemic ». *Pediatric Annals* 35 (11): 773- 74.
- Silva, Ernesto, Martin O’Gorman, Susanne Becker, Gert Auer, Anders Eklund, Johan Grunewald, et Asa M. Wheelock. 2010. « In the Eye of the Beholder: Does the Master See the Same Spots as the Novice? ». *Journal of Proteome Research* 9 (3): 1522- 32. doi:10.1021/pr9010298.
- Simeone, Kristina A., Shivkumar Sabesan, Do Young Kim, John F. Kerrigan, Jong M. Rho, et Timothy A. Simeone. 2011. « L-Type Calcium Channel Blockade Reduces Network Activity in Human Epileptic Hypothalamic Hamartoma Tissue ». *Epilepsia* 52 (3): 531- 40. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02942.x.
- Sinclair, Lindsey I., Hannah M. Tayler, et Seth Love. 2015. « Synaptic Protein Levels Altered in Vascular Dementia ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 41 (4): 533- 43. doi:10.1111/nan.12215.
- Singletary, S. Eva. 2003. « Radiofrequency Ablation of Breast Cancer ». *The American Surgeon* 69 (1): 37- 40.

- Soobrattee, M. A., V. S. Neerghen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma, et T. Bahorun. 2005. « Phenolics as Potential Antioxidant Therapeutic Agents: Mechanism and Actions ». *Mutation Research* 579 (1- 2): 200- 213. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023.
- Spengler, J., et A. Jeschke. 2004. « [Jejunal intussusception of an inflammatory fibrinoid polyp] ». *Ultraschall in Der Medizin (Stuttgart, Germany: 1980)* 25 (6): 450- 52. doi:10.1055/s-2004-813694.
- Spiteller, Gerhard. 2007. « The Important Role of Lipid Peroxidation Processes in Aging and Age Dependent Diseases ». *Molecular Biotechnology* 37 (1): 5- 12.
- Spranger, Isabel, Baoshan Sun, Ana M. Mateus, Vítor de Freitas, et Jorge M. Ricardo-da-Silva. 2008. « Chemical Characterization and Antioxidant Activities of Oligomeric and Polymeric Procyanidin Fractions from Grape Seeds ». *Food Chemistry* 108 (2): 519- 32. doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.004.
- Stafford, J. R., W. J. Pollock, et B. C. Wenzel. 1984. « Oncocytic Mucoepidermoid Tumor of the Bronchus ». *Cancer* 54 (1): 94- 99.
- Stampa, Matthieu de, Aurélien Latouche, Francis Derriennic, Christine Monfort, Annie Touranchet, et Bernard Cassou. 2012. « The Course of Physical Functional Limitations and Occupational Conditions in a Middle-Aged Working Population in France ». *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)* 7 (1): 5. doi:10.1186/1745-6673-7-5.
- Starkov, Anatoly A. 2010. « Measurement of Mitochondrial ROS Production ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 648: 245- 55. doi:10.1007/978-1-60761-756-3_16.
- Stasyk, Taras, et Lukas A. Huber. 2004. « Zooming in: Fractionation Strategies in Proteomics ». *Proteomics* 4 (12): 3704- 16. doi:10.1002/pmic.200401048.
- Steen, Hanno, et Matthias Mann. 2004. « The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (9): 699- 711. doi:10.1038/nrm1468.
- Subba Rao, G. S. R., Paturu Kondaiah, Sanjay K. Singh, Palaniyandi Ramanan, et Michael B. Sporn. 2008. « Chemical Modifications of Natural Triterpenes - Glycyrrhetic and Boswellic Acids: Evaluation of Their Biological Activity ». *Tetrahedron* 64 (51): 11541- 48. doi:10.1016/j.tet.2008.10.035.
- Suh, Jae Myoung, Daniel Zeve, Renee McKay, Jin Seo, Zack Salo, Robert Li, Michael Wang, et Jonathan M. Graff. 2007. « Adipose Is a Conserved Dosage-Sensitive Antiobesity Gene ». *Cell Metabolism* 6 (3): 195- 207. doi:10.1016/j.cmet.2007.08.001.
- Sun, Yu, Jie Chen, et Basil Rigas. 2009. « Chemopreventive Agents Induce Oxidative Stress in Cancer Cells Leading to COX-2 Overexpression and COX-2-Independent Cell Death ». *Carcinogenesis* 30 (1): 93- 100. doi:10.1093/carcin/bgn242.
- Swank, R. T., et K. D. Munkres. 1971. « Molecular Weight Analysis of Oligopeptides by Electrophoresis in Polyacrylamide Gel with Sodium Dodecyl Sulfate ». *Analytical Biochemistry* 39 (2): 462- 77.

T

- Tarze, A., A. Deniaud, M. Le Bras, E. Maillier, D. Molle, N. Larochette, N. Zamzami, G. Jan, G. Kroemer, et C. Brenner. 2007. « GAPDH, a Novel Regulator of the pro-Apoptotic Mitochondrial Membrane Permeabilization ». *Oncogene* 26 (18): 2606- 20. doi:10.1038/sj.onc.1210074.
- Terra, Renata M. S., Antônio F. M. Pinto, Jorge A. Guimarães, et Jay W. Fox. 2009. « Proteomic Profiling of Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): Insights into Venom Induced Pathology ». *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 54 (6): 836- 44. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.010.
- Terra, Ximena, Gemma Montagut, Mario Bustos, Niurka Llopiz, Anna Ardèvol, Cinta Bladé, Juan Fernández-Larrea, et al. 2009. « Grape-Seed Procyanidins Prevent Low-Grade Inflammation by Modulating Cytokine Expression in Rats Fed a High-Fat Diet ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (3): 210- 18. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.02.005.
- Thomas, Db. 2002. « 27 The Unit of Hepatic Function in the Context Provided by the Unit of Hepatic Organisation ». *Journal of Anatomy* 201 (5): 424- 25.

- Thomas, Ravi, Rajul Parikh, Ronnie George, Rajesh S. Kumar, et Jayaprakash Muliyl. 2003. « Five-Year Risk of Progression of Ocular Hypertension to Primary Open Angle Glaucoma. A Population-Based Study ». *Indian Journal of Ophthalmology* 51 (4): 329- 33.
- Tokarski, Caroline, Cécile Cren-Olivé, Marianne Fillet, et Christian Rolando. 2006. « High-Sensitivity Staining of Proteins for One- and Two-Dimensional Gel Electrophoresis Using Post Migration Covalent Staining with a Ruthenium Fluorophore ». *Electrophoresis* 27 (7): 1407- 16. doi:10.1002/elps.200500426.
- Towbin, H., T. Staehelin, et J. Gordon. 1979. « Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9): 4350- 54.
- Turrens, Julio F. 2003. « Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species ». *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2): 335- 44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.

U

- Unger, R. H. 1995. « Lipotoxicity in the Pathogenesis of Obesity-Dependent NIDDM. Genetic and Clinical Implications ». *Diabetes* 44 (8): 863- 70.
- Unger, Roger H., et Lelio Orci. 2002. « Lipoapoptosis: Its Mechanism and Its Diseases ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1585 (2- 3): 202- 12.

V

- Valko, M., H. Morris, et M. T. D. Cronin. 2005. « Metals, Toxicity and Oxidative Stress ». *Current Medicinal Chemistry* 12 (10): 1161- 1208.
- Valls-Belles, Victoria, Mari Carmen Torres, Pilar Muñoz, Sagrario Beltran, Jesús Roman Martinez-Alvarez, et Pilar Codoñer-Franch. 2006. « Defatted Milled Grape Seed Protects Adriamycin-Treated Hepatocytes against Oxidative Damage ». *European Journal of Nutrition* 45 (5): 251- 58. doi:10.1007/s00394-006-0591-1.
- Vertuani, Silvia, Angela Angusti, et Stefano Manfredini. 2004. « The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview ». *Current Pharmaceutical Design* 10 (14): 1677- 94.
- Vidal-Puig, A., M. Jimenez-Liñan, B. B. Lowell, A. Hamann, E. Hu, B. Spiegelman, J. S. Flier, et D. E. Moller. 1996. « Regulation of PPAR Gamma Gene Expression by Nutrition and Obesity in Rodents ». *The Journal of Clinical Investigation* 97 (11): 2553- 61. doi:10.1172/JCI118703.
- Viswanathan, Surya, Mustafa Unlü, et Jonathan S. Minden. 2006. « Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis ». *Nature Protocols* 1 (3): 1351- 58. doi:10.1038/nprot.2006.234.
- Voyksner, R. D., et H. Lee. 1999. « Investigating the Use of an Octupole Ion Guide for Ion Storage and High-Pass Mass Filtering to Improve the Quantitative Performance of Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 13 (14): 1427- 37. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19990730)13:14<1427::AID-RCM662>3.0.CO;2-5.

W

- Wang, Chen, Xuhong Hou, Yuqian Bao, Jiemin Pan, Yuhua Zuo, Wenhong Zhong, Weiping Jia, et Kunsan Xiang. 2010. « The Metabolic Syndrome Increased Risk of Cardiovascular Events in Chinese--a Community Based Study ». *International Journal of Cardiology* 139 (2): 159- 65. doi:10.1016/j.ijcard.2008.10.012.
- Wang, G. J., N. D. Volkow, J. Logan, N. R. Pappas, C. T. Wong, W. Zhu, N. Netusil, et J. S. Fowler. 2001. « Brain Dopamine and Obesity ». *Lancet (London, England)* 357 (9253): 354- 57.
- Wang, Xiao-Chun, Chang-Hao Sun, Xiao-Hong Zhang, Li-Jun Zhao, et Jing Zheng. 2005. « [Effects of early weaning on the blood glucose, blood lipid and hormone of rat fed a high fat diet] ». *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research* 34 (3): 331- 33.
- Ward, Michael A., Cynthia M. Carlsson, Mehul A. Trivedi, Mark A. Sager, et Sterling C. Johnson. 2005. « The Effect of Body Mass Index on Global Brain Volume in Middle-Aged Adults: A Cross Sectional Study ». *BMC Neurology* 5: 23. doi:10.1186/1471-2377-5-23.

- Washburn, Michael P., Ryan Ulaszek, Cosmin Deciu, David M. Schieltz, et John R. Yates. 2002. « Analysis of Quantitative Proteomic Data Generated via Multidimensional Protein Identification Technology ». *Analytical Chemistry* 74 (7): 1650- 57.
- Wassmann, Sven, Kerstin Wassmann, et Georg Nickenig. 2004. « Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells ». *Hypertension* 44 (4): 381- 86. doi:10.1161/01.HYP.0000142232.29764.a7.
- Wells, Jonathan C. K. 2006. « The Evolution of Human Fatness and Susceptibility to Obesity: An Ethological Approach ». *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 81 (2): 183- 205. doi:10.1017/S1464793105006974.
- Wennberg, Richard, et Camilla Zimmermann. 2006. « Progress: Measuring the Benefit. Re: The Numbers Needed to Treat for Neurological Disorders ». *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 33 (2): 254; author reply 254.
- West, D. B., et B. York. 1998. « Dietary Fat, Genetic Predisposition, and Obesity: Lessons from Animal Models ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 67 (3 Suppl): 505S- 512S.
- White, Ian R., Russell Pickford, John Wood, J. Mark Skehel, Bevan Gangadharan, et Paul Cutler. 2004. « A Statistical Comparison of Silver and SYPRO Ruby Staining for Proteomic Analysis ». *Electrophoresis* 25 (17): 3048- 54. doi:10.1002/elps.200405947.
- Whitmer, Rachel A., Erica P. Gunderson, Charles P. Quesenberry, Jufen Zhou, et Kristine Yaffe. 2007. « Body Mass Index in Midlife and Risk of Alzheimer Disease and Vascular Dementia ». *Current Alzheimer Research* 4 (2): 103- 9.
- Williamson, Brian L., Jason Marchese, et Nicholas A. Morrice. 2006. « Automated Identification and Quantification of Protein Phosphorylation Sites by LC/MS on a Hybrid Triple Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5 (2): 337- 46. doi:10.1074/mcp.M500210-MCP200.
- Wise, M. J., T. G. Littlejohn, et I. Humphery-Smith. 1997. « Peptide-Mass Fingerprinting and the Ideal Covering Set for Protein Characterisation ». *Electrophoresis* 18 (8): 1399- 1409. doi:10.1002/elps.1150180815.
- Wojda, Urszula, Elzbieta Salinska, et Jacek Kuznicki. 2008. « Calcium Ions in Neuronal Degeneration ». *IUBMB Life* 60 (9): 575- 90. doi:10.1002/iub.91.
- Wolters, D. A., M. P. Washburn, et J. R. Yates. 2001. « An Automated Multidimensional Protein Identification Technology for Shotgun Proteomics ». *Analytical Chemistry* 73 (23): 5683- 90.

X

- Xie, Zhen, Joel M. Bowman, et Xiubin Zhang. 2006. « Quasiclassical Trajectory Study of the Reaction $H+CH_4(Nu_3 = 0,1) \rightarrow CH_3+H_2$ Using a New Ab Initio Potential Energy Surface ». *The Journal of Chemical Physics* 125 (13): 133120. doi:10.1063/1.2238871.

Y

- Yang, Ming, Huizhong Su, Tomoyoshi Soga, Kamil R. Kranc, et Patrick J. Pollard. 2014. « Prolyl Hydroxylase Domain Enzymes: Important Regulators of Cancer Metabolism ». *Hypoxia (Auckland, N.Z.)* 2: 127- 42. doi:10.2147/HP.S47968.
- Yarlagadda, Atmaram, Shaifali Kaushik, et Anita H. Clayton. 2007. « Blood Brain Barrier: The Role of Calcium Homeostasis ». *Psychiatry (Edgmont (Pa.: Township))* 4 (12): 55- 59.
- Yip, James, Xiaokun Geng, Jiamei Shen, et Yuchuan Ding. 2016. « Cerebral Gluconeogenesis and Diseases ». *Frontiers in Pharmacology* 7: 521. doi:10.3389/fphar.2016.00521.
- Yki-Järvinen, H., et J. Westerbacka. 2005. « The Fatty Liver and Insulin Resistance ». *Current Molecular Medicine* 5 (3): 287- 95.
- Yoshimura, Rikio, Masahide Matsuyama, Kenji Tsuchida, Yutaka Kawahito, Hajime Sano, et Tatsuya Nakatani. 2003. « Expression of Lipoxygenase in Human Bladder Carcinoma and Growth Inhibition by Its Inhibitors ». *The Journal of Urology* 170 (5): 1994- 99. doi:10.1097/01.ju.0000080296.54262.c8.

Yuan, Yuan, Mei Huang, Yu-Xin Pang, Fu-Lai Yu, Ce Chen, Li-Wei Liu, Zhen-Xia Chen, Ying-Bo Zhang, Xiao-Lu Chen, et Xuan Hu. 2016. « Variations in Essential Oil Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from *Blumea Balsamifera* (L.) DC. at Different Growth Times ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 21 (8). doi:10.3390/molecules21081024.

Z

Zhang, Xiaochun, Feng Dong, Jun Ren, Meghan J. Driscoll, et Bruce Culver. 2005. « High Dietary Fat Induces NADPH Oxidase-Associated Oxidative Stress and Inflammation in Rat Cerebral Cortex ». *Experimental Neurology* 191 (2): 318- 25. doi:10.1016/j.expneurol.2004.10.011.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, et J. M. Friedman. 1994. « Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue ». *Nature* 372 (6505): 425- 32. doi:10.1038/372425a0.

Zybaylov, Boris, Michael K. Coleman, Laurence Florens, et Michael P. Washburn. 2005. « Correlation of Relative Abundance Ratios Derived from Peptide Ion Chromatograms and Spectrum Counting for Quantitative Proteomic Analysis Using Stable Isotope Labeling ». *Analytical Chemistry* 77 (19): 6218- 24. doi:10.1021/ac050846r.

Annexes

Accession	Peptides used for quantitation	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Highest mean	Description	HFD1	HFD2	HFD3	HG1	HG2	HG3
gi 56605990	2	129	5,91E-05	46,59	HG	leucine-rich protein 157	1,03E+03	0,00E+00	0,00E+00	1,41E+04	1,66E+04	1,74E+04
gi 109458918	3	160	2,73E-05	40,39	HG	PREDICTED: similar to adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit	2,76E+02	1,08E+02	3,16E+02	9,50E+03	1,02E+04	8,50E+03
gi 13929106	2	71	3,73E-02	38,79	HG	vesicular inhibitory amino acid transporter	3,35E+02	1,17E+01	6,01E+02	1,63E+04	1,81E+04	2,35E+03
gi 77404395	2	84	3,09E-02	38,69	HG	p105 coactivator	4,15E+02	1,77E+02	3,44E+02	1,24E+04	1,98E+04	4,01E+03
gi 109491389	3	124	4,88E-02	36,27	HG	PREDICTED: similar to myosin XVIIIa	7,11E+02	1,28E+02	4,11E+02	1,95E+04	2,41E+04	1,73E+03
gi 13242269	2	80	4,98E-02	25,13	HG	GABA transporter protein	5,09E+03	7,51E+03	7,60E+03	2,45E+05	2,45E+05	1,71E+04
gi 109490574	4	182	8,12E-05	18,72	HG	PREDICTED: similar to cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 isoform 1	2,60E+03	4,17E+03	4,55E+03	6,18E+04	7,85E+04	7,15E+04
gi 27688933	2	65	3,54E-02	16,01	HG	PREDICTED: similar to procollagen, type I, alpha 1	2,19E+04	7,42E+03	7,31E+03	2,18E+05	3,12E+05	5,60E+04
gi 13162302	2	66	2,13E-02	14,28	HG	dynactin 1	1,14E+03	1,12E+03	8,21E+02	2,03E+04	1,83E+04	5,45E+03
gi 17105360	4	197	2,65E-02	13,64	HG	synaptic vesicle glycoprotein 2b	3,41E+03	3,14E+03	2,11E+03	2,50E+04	6,62E+04	2,70E+04
gi 6978557	10	535	3,80E-02	13,45	HG	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	1,10E+04	2,81E+04	2,95E+04	3,39E+05	4,98E+05	8,70E+04
gi 8392935	8	468	3,67E-02	12,92	HG	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	1,64E+04	9,90E+03	1,17E+04	1,93E+05	2,55E+05	4,38E+04
gi 9507127	6	206	4,76E-02	11,71	HG	SNAP25-interacting protein	1,24E+04	1,22E+04	1,27E+04	2,56E+05	1,37E+05	4,43E+04
gi 8394158	2	123	1,07E-02	11,25	HG	fatty acid synthase	2,86E+03	9,91E+02	1,22E+03	1,78E+04	2,77E+04	1,16E+04
gi 78126161	9	421	4,29E-02	11,14	HG	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2 isoform b	4,37E+04	3,12E+04	3,58E+04	4,25E+05	6,88E+05	1,18E+05
gi 17530967;gi	5	227	4,26E-02	11,04	HG	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 2	1,43E+04	1,06E+04	7,74E+03	1,63E+05	1,73E+05	2,44E+04
gi 62665288	3	176	3,27E-05	10,89	HG	PREDICTED: similar to alanyl-tRNA synthetase	5,97E+03	2,99E+03	4,12E+03	4,99E+04	4,28E+04	4,97E+04
gi 6978543	15	813	3,46E-02	10,86	HG	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide	1,51E+05	1,24E+05	1,23E+05	1,86E+06	2,07E+06	3,88E+05
gi 11496271	2	97	3,42E-02	10,84	HG	cytoplasmic linker 2	1,32E+03	2,64E+02	6,71E+02	1,32E+04	8,28E+03	2,94E+03
gi 13591880	4	166	3,44E-02	10,55	HG	proteolipid protein	4,64E+05	3,57E+05	3,41E+05	5,26E+06	5,89E+06	1,12E+06
gi 16758736	2	89	4,23E-05	9,79	HG	neuroligin 1	2,52E+03	1,27E+03	2,32E+03	2,17E+04	1,82E+04	1,98E+04
gi 34858442	4	216	1,70E-02	9,77	HG	PREDICTED: similar to Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 (Ubiquitin thiolesterase 5) (Isope	1,27E+04	9,34E+03	9,77E+03	1,58E+05	9,49E+04	5,75E+04
gi 13591902	3	160	5,88E-04	9,71	HG	actinin, alpha 1	4,70E+03	2,85E+03	8,02E+03	6,05E+04	4,28E+04	4,78E+04
gi 109473862	2	90	7,17E-03	9,70	HG	PREDICTED: similar to IQ motif and Sec7 domain 1 isoform 2	1,98E+03	1,88E+03	5,83E+02	1,09E+04	2,05E+04	1,18E+04
gi 13242271	2	133	3,75E-02	8,88	HG	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11	1,33E+04	1,13E+04	1,22E+04	1,10E+05	1,78E+05	3,83E+04
gi 34873499	8	360	6,72E-03	8,67	HG	PREDICTED: similar to aminopeptidase puromycin sensitive	1,43E+04	1,53E+04	1,64E+04	1,16E+05	1,88E+05	9,57E+04
gi 57977297	3	173	4,62E-02	8,32	HG	reticulin 3 isoform A	8,91E+03	7,96E+03	1,07E+04	1,14E+05	9,91E+04	1,60E+04
gi 55925610	6	295	2,88E-02	8,17	HG	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	1,35E+04	8,22E+03	1,22E+04	1,17E+05	1,29E+05	3,14E+04
gi 10048483	9	368	2,88E-02	7,83	HG	multidomain presynaptic cytomatrix protein Piccolo	1,51E+04	1,66E+04	2,23E+04	2,31E+05	1,17E+05	7,48E+04
gi 74271849	2	116	3,07E-02	7,79	HG	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	4,28E+03	4,94E+03	5,15E+03	6,11E+04	3,29E+04	1,80E+04
gi 109491767	3	115	3,18E-04	7,48	HG	PREDICTED: similar to Importin beta-1 subunit (Pore targeting complex 97 kDa subunit) (PTAC9'	1,29E+04	9,70E+03	9,96E+03	7,38E+04	7,41E+04	9,55E+04
gi 6978547;gi	18	1127	1,69E-02	7,34	HG	Na+/K+ -ATPase alpha 3 subunit	4,63E+05	4,24E+05	3,64E+05	3,51E+06	4,23E+06	1,45E+06
gi 31542335	3	164	1,40E-02	7,24	HG	calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1	1,04E+04	4,57E+03	5,68E+03	5,17E+04	7,06E+04	2,71E+04
gi 77627990	10	446	2,48E-02	7,22	HG	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a isoform 1	5,93E+04	4,68E+04	4,22E+04	4,56E+05	4,77E+05	1,37E+05
gi 12408298	4	144	1,15E-02	7,19	HG	dipeptidylpeptidase 6	1,96E+04	1,48E+04	1,60E+04	1,31E+05	1,65E+05	6,64E+04
gi 56799396	2	78	2,28E-02	7,13	HG	myosin IC	4,81E+02	3,73E+02	5,81E+02	4,74E+03	4,08E+03	1,41E+03
gi 62659497	2	119	2,33E-04	7,07	HG	PREDICTED: similar to Laminin gamma-1 chain precursor (Laminin B2 chain)	4,20E+03	5,22E+03	4,04E+03	2,73E+04	3,17E+04	3,62E+04
gi 61557085	29	1487	4,31E-03	6,83	HG	spectrin beta 2	3,30E+05	1,97E+05	2,10E+05	2,02E+06	1,92E+06	1,09E+06
gi 109483500	4	175	3,84E-03	6,78	HG	PREDICTED: similar to Dmx-like 2	1,90E+04	1,56E+04	1,65E+04	9,79E+04	1,55E+05	9,35E+04
gi 18093104	4	218	1,30E-02	6,72	HG	casK-interacting protein 1	9,79E+03	7,21E+03	8,67E+03	8,57E+04	4,16E+04	4,51E+04
gi 30842811	6	323	2,33E-03	6,70	HG	synaptic Ras GTPase activating protein 1 homolog	1,16E+04	9,63E+03	1,03E+04	8,94E+04	6,90E+04	5,31E+04
gi 31377489	17	686	1,06E-02	6,59	HG	dynein, cytoplasmic, heavy chain 1	3,59E+04	3,12E+04	3,07E+04	2,48E+05	2,80E+05	1,18E+05
gi 16923996	3	196	6,43E-03	6,54	HG	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	2,22E+04	1,37E+04	2,38E+04	1,57E+05	1,55E+05	7,90E+04
gi 61889103	2	129	2,38E-02	6,45	HG	claudin 11	6,02E+04	4,68E+04	4,76E+04	3,49E+05	4,96E+05	1,53E+05
gi 109506690	2	89	1,72E-03	6,43	HG	PREDICTED: similar to AFG3-like protein 2 (Paraplegin-like protein)	3,36E+03	1,69E+03	2,89E+03	2,15E+04	1,45E+04	1,50E+04
gi 13540714	18	752	2,50E-02	6,40	HG	plectin 1	4,04E+04	3,24E+04	3,39E+04	3,41E+05	2,38E+05	1,03E+05
gi 57526868	2	94	4,68E-02	6,34	HG	T-kininogen II precursor	1,21E+04	5,47E+03	7,46E+03	3,68E+04	2,87E+04	9,31E+04

gi 13928704	8	410	2,52E-02	6,27	HG	myosin heavy chain 10, non-muscle	3,83E+04	1,31E+04	1,38E+04	1,90E+05	1,62E+05	5,69E+04
gi 6978545	15	765	2,63E-02	6,01	HG	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 polypeptide	1,11E+05	8,91E+04	1,05E+05	6,40E+05	9,21E+05	2,75E+05
gi 31543764	41	2089	2,09E-02	5,80	HG	alpha-spectrin 2	5,04E+05	3,41E+05	3,16E+05	2,97E+06	2,77E+06	9,97E+05
gi 58865966	5	229	3,43E-02	5,54	HG	tumor rejection antigen gp96 (predicted)	3,11E+04	2,24E+04	3,88E+04	1,01E+05	1,29E+05	2,82E+05
gi 51890229	2	74	8,56E-03	5,54	HG	heat shock 90kDa protein 1, beta	1,60E+04	1,47E+04	9,75E+03	8,25E+04	9,66E+04	4,48E+04
gi 62945278	8	390	2,82E-03	5,47	HG	hypothetical protein LOC360975	6,06E+04	3,96E+04	4,53E+04	3,20E+05	2,87E+05	1,88E+05
gi 62078893	9	763	5,08E-04	5,22	HG	hypothetical protein LOC314432	1,06E+05	8,47E+04	9,33E+04	5,31E+05	5,50E+05	4,03E+05
gi 16923964	12	684	2,71E-02	5,20	HG	contactin 1	2,81E+05	1,99E+05	2,10E+05	1,56E+06	1,55E+06	4,82E+05
gi 6981622	2	81	9,82E-03	5,16	HG	synaptophysin	1,14E+05	9,46E+04	1,05E+05	6,27E+05	6,79E+05	3,10E+05
gi 9507135	9	474	2,77E-02	5,14	HG	beta-spectrin 3	7,85E+04	4,59E+04	5,57E+04	4,45E+05	3,48E+05	1,32E+05
gi 109462307	4	233	5,93E-03	5,09	HG	PREDICTED: neural cell adhesion molecule L1	1,46E+04	1,45E+04	1,61E+04	9,44E+04	8,67E+04	4,89E+04
gi 11612663	2	76	1,24E-02	5,06	HG	FXD domain-containing ion transport regulator 7	1,97E+04	1,72E+04	1,52E+04	1,26E+05	7,99E+04	5,76E+04
gi 62641302	3	136	1,07E-02	5,05	HG	PREDICTED: similar to tumor suppressor candidate 5	5,35E+04	4,39E+04	4,27E+04	3,06E+05	1,36E+05	2,66E+05
gi 6980972	2	113	1,51E-03	5,03	HG	glutamate oxaloacetate transaminase 2	2,45E+04	2,45E+04	3,06E+04	1,10E+05	1,25E+05	1,65E+05
gi 47058952	4	169	9,98E-04	4,82	HG	neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	2,84E+04	1,78E+04	2,31E+04	1,30E+05	1,15E+05	8,91E+04
gi 83816939	6	314	8,18E-05	4,79	HG	alpha-1-inhibitor III	4,23E+04	3,54E+04	3,43E+04	1,79E+05	1,96E+05	1,62E+05
gi 28467005;gi	3	133	2,73E-02	4,76	HG	heat shock protein 1, alpha	3,70E+04	3,98E+04	3,26E+04	9,50E+04	2,69E+05	1,57E+05
gi 6981478	2	78	2,28E-02	4,74	HG	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	2,49E+03	2,56E+03	2,46E+03	1,79E+04	1,09E+04	6,70E+03
gi 24025637	6	250	1,24E-02	4,61	HG	heat shock protein 4	3,86E+04	2,79E+04	3,61E+04	2,25E+05	1,42E+05	1,06E+05
gi 9506497	25	1363	3,60E-02	4,58	HG	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	5,10E+05	3,08E+05	3,16E+05	1,88E+06	2,61E+06	7,10E+05
gi 109464243	4	135	5,58E-04	4,45	HG	PREDICTED: similar to Versican core protein precursor (Chondroitin sulfate proteoglycan core p	6,98E+03	9,18E+03	9,08E+03	4,30E+04	3,13E+04	3,81E+04
gi 9507159	2	104	2,03E-03	4,32	HG	synapsin 1	2,18E+04	1,23E+04	1,53E+04	5,95E+04	8,83E+04	6,53E+04
gi 109467596	9	457	1,09E-02	4,25	HG	PREDICTED: similar to ankyrin 2 isoform 1	4,03E+04	6,78E+04	5,59E+04	2,96E+05	2,63E+05	1,38E+05
gi 77917546	5	286	1,56E-02	4,23	HG	inner membrane protein, mitochondrial	1,18E+05	8,00E+04	9,26E+04	3,16E+05	3,11E+05	6,00E+05
gi 62647644	2	71	1,02E-04	4,12	HG	PREDICTED: similar to Alpha-2 catenin (Alpha-catenin-related protein) (Alpha N-catenin)	2,79E+03	2,69E+03	3,46E+03	1,11E+04	1,35E+04	1,23E+04
gi 13928706	12	539	6,97E-03	4,10	HG	neural cell adhesion molecule 1	1,36E+05	1,46E+05	1,26E+05	6,23E+05	6,89E+05	3,60E+05
gi 70778983	2	109	2,18E-03	4,09	HG	NonO/p54nrb homolog	3,59E+04	3,01E+04	3,58E+04	1,40E+05	1,07E+05	1,69E+05
gi 11559935	3	192	4,85E-02	4,07	HG	myosin Va	4,67E+03	6,02E+03	6,37E+03	2,68E+04	3,49E+04	7,71E+03
gi 19924211	2	84	3,00E-02	3,95	HG	neurofascin	6,13E+04	4,14E+04	4,00E+04	2,27E+05	2,54E+05	8,20E+04
gi 109464712	7	317	1,25E-03	3,95	HG	PREDICTED: similar to Heat shock 70 kDa protein 4L (Osmotic stress protein 94) (Heat shock 70-	8,55E+04	6,12E+04	7,10E+04	2,36E+05	2,80E+05	3,43E+05
gi 9506427	14	572	1,90E-02	3,93	HG	bassoon protein	9,38E+04	9,87E+04	1,07E+05	5,79E+05	3,35E+05	2,62E+05
gi 109468875	8	404	1,77E-03	3,88	HG	PREDICTED: similar to 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta 1 (PLC-I	1,12E+04	1,04E+04	1,22E+04	3,56E+04	5,35E+04	4,19E+04
gi 61889073	3	147	1,09E-03	3,83	HG	matrin 3	2,04E+04	2,21E+04	2,21E+04	9,79E+04	8,18E+04	6,79E+04
gi 13591886	25	1167	9,20E-03	3,80	HG	microtubule-associated protein 1 A	4,03E+05	4,71E+05	4,79E+05	2,33E+06	1,58E+06	1,23E+06
gi 109464562	2	89	9,09E-03	3,79	HG	PREDICTED: similar to Catenin delta-2 (Neural plakophilin-related ARM-repeat protein) (NPRAP	5,49E+03	4,70E+03	5,69E+03	2,67E+04	2,02E+04	1,34E+04
gi 6978549	4	239	1,12E-04	3,73	HG	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	1,26E+06	1,04E+06	9,77E+05	4,51E+06	3,96E+06	3,78E+06
gi 109505299	2	77	1,87E-03	3,72	HG	PREDICTED: similar to G protein-coupled receptor 158 isoform a	6,08E+03	3,47E+03	7,46E+03	2,56E+04	1,92E+04	1,85E+04
gi 77539778	5	303	8,31E-03	3,71	HG	alpha actinin 4	5,96E+04	4,94E+04	5,35E+04	1,86E+05	1,46E+05	2,71E+05
gi 8392839	2	96	5,92E-04	3,70	HG	ATP citrate lyase	1,23E+04	1,13E+04	1,50E+04	5,28E+04	5,06E+04	3,96E+04
gi 29789026	11	566	8,96E-03	3,69	HG	neurofilament, heavy polypeptide	2,90E+05	3,09E+05	3,17E+05	1,19E+06	1,46E+06	7,32E+05
gi 109464990	2	76	2,94E-03	3,62	HG	PREDICTED: similar to tripartite motif protein TRIM2	2,10E+04	1,07E+04	1,35E+04	4,40E+04	5,26E+04	6,70E+04
gi 12083599	3	161	7,67E-05	3,62	HG	dystonia 2, torsion (autosomal recessive)	2,40E+05	2,27E+05	1,92E+05	7,19E+05	8,15E+05	8,49E+05
gi 109499222	2	80	1,15E-02	3,59	HG	PREDICTED: similar to isoleucine-tRNA synthetase 2, mitochondrial	4,61E+03	6,94E+03	3,23E+03	1,58E+04	2,43E+04	1,30E+04
gi 13162320	2	93	1,67E-02	3,59	HG	neurogranin	7,03E+04	7,71E+04	8,30E+04	3,51E+05	1,52E+05	3,24E+05
gi 109492922	9	399	1,75E-02	3,59	HG	PREDICTED: similar to Synaptotagmin-1 (Synaptic inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1)	2,27E+05	1,61E+05	1,71E+05	9,71E+05	5,39E+05	4,93E+05
gi 17865351;gi	8	459	2,82E-02	3,50	HG	valosin-containing protein	1,27E+05	1,00E+05	9,96E+04	2,77E+05	2,81E+05	5,85E+05
gi 66730360	3	168	8,86E-03	3,48	HG	microtubule-associated protein 4	2,84E+04	2,18E+04	2,04E+04	9,03E+04	5,29E+04	1,02E+05
gi 6981022	12	586	3,40E-03	3,47	HG	hexokinase 1	3,38E+05	3,04E+05	2,72E+05	9,63E+05	1,34E+06	8,67E+05
gi 11560135	4	309	3,09E-02	3,45	HG	brain abundant, membrane attached signal protein 1	1,40E+06	7,87E+05	7,83E+05	4,61E+06	1,60E+06	4,05E+06
gi 16758008	5	238	1,13E-02	3,43	HG	plasma membrane calcium ATPase 1	4,04E+04	4,32E+04	4,00E+04	1,63E+05	1,74E+05	8,63E+04
gi 9507167	2	110	2,01E-02	3,42	HG	synaptogyrin 1	8,64E+04	6,98E+04	7,47E+04	2,77E+05	3,64E+05	1,50E+05

gi 34328532	2	84	1,75E-02	3,42	HG	gamma-aminobutyric acid A receptor, alpha 1	7,70E+03	7,27E+03	7,87E+03	3,75E+04	2,27E+04	1,80E+04
gi 62645079	4	251	1,02E-03	3,42	HG	PREDICTED: similar to kinesin family member 5C	2,53E+04	2,13E+04	2,34E+04	9,27E+04	8,13E+04	6,56E+04
gi 17985955	2	59	1,22E-02	3,41	HG	double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1	2,28E+04	2,75E+04	2,76E+04	8,48E+04	6,01E+04	1,21E+05
gi 58865372	8	346	1,49E-05	3,35	HG	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	7,90E+04	6,93E+04	7,05E+04	2,56E+05	2,46E+05	2,30E+05
gi 61098186	2	73	3,56E-03	3,34	HG	fibrinogen, gamma polypeptide	1,19E+04	7,71E+03	5,22E+03	2,74E+04	2,22E+04	3,35E+04
gi 6981668	6	372	1,46E-02	3,34	HG	tenascin R	1,08E+05	1,15E+05	9,77E+04	4,05E+05	4,54E+05	2,09E+05
gi 25282419	2	66	3,86E-02	3,33	HG	calnexin	3,85E+04	4,37E+04	4,04E+04	1,25E+05	7,25E+04	2,11E+05
gi 54312088	5	227	1,95E-02	3,32	HG	plasma membrane calcium ATPase 4	5,58E+04	5,29E+04	5,76E+04	1,93E+05	2,53E+05	1,07E+05
gi 8394030	4	189	3,37E-03	3,31	HG	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	5,99E+04	5,28E+04	5,39E+04	1,87E+05	2,26E+05	1,40E+05
gi 8393296	3	158	4,46E-02	3,23	HG	eukaryotic translation elongation factor 2	3,96E+04	3,69E+04	3,45E+04	7,81E+04	8,73E+04	1,93E+05
gi 6981182	27	1417	6,58E-03	3,15	HG	microtubule-associated protein 2	6,19E+05	6,71E+05	7,06E+05	2,76E+06	1,89E+06	1,65E+06
gi 109472298	7	407	7,24E-03	3,14	HG	PREDICTED: similar to AP2 associated kinase 1	9,27E+04	8,36E+04	9,21E+04	3,56E+05	1,97E+05	2,90E+05
gi 109480688	6	369	1,25E-03	3,11	HG	PREDICTED: similar to oxidation resistance 1	4,71E+04	5,76E+04	5,98E+04	2,01E+05	1,44E+05	1,67E+05
gi 109509584	3	136	3,79E-02	3,09	HG	PREDICTED: similar to Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) (Protein kinase C	5,40E+05	4,31E+05	4,46E+05	1,38E+06	7,86E+05	2,21E+06
gi 16758732	3	124	1,19E-02	3,04	HG	reticulin 1	3,83E+04	3,92E+04	3,68E+04	1,23E+05	1,50E+05	7,48E+04
gi 34853474	19	1039	8,13E-04	3,00	HG	PREDICTED: similar to Microtubule-associated protein 1B (MAP 1B) (Neuraxin)	3,16E+05	4,60E+05	4,48E+05	1,41E+06	1,17E+06	1,09E+06
gi 109507853	3	144	5,78E-04	2,97	HG	PREDICTED: similar to vacuolar protein sorting 35	3,39E+04	2,97E+04	3,06E+04	7,91E+04	1,04E+05	9,67E+04
gi 8393180	5	178	1,27E-03	2,95	HG	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	2,50E+05	2,29E+05	2,05E+05	7,96E+05	5,77E+05	6,46E+05
gi 11560002	6	307	2,66E-02	2,95	HG	amphiphysin 1	1,10E+05	1,68E+05	2,07E+05	6,82E+05	2,93E+05	4,57E+05
gi 109504667	4	180	1,26E-02	2,95	HG	PREDICTED: similar to G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	3,51E+04	3,37E+04	3,12E+04	1,10E+05	6,18E+04	1,23E+05
gi 40538860	4	180	2,32E-03	2,94	HG	aconitase 2, mitochondrial	8,04E+04	6,85E+04	7,20E+04	1,67E+05	2,41E+05	2,41E+05
gi 16758540	2	83	1,63E-02	2,91	HG	CLIP-associating protein 2	9,03E+03	6,38E+03	6,40E+03	1,66E+04	1,72E+04	2,97E+04
gi 8392872	4	174	1,84E-05	2,91	HG	adaptor protein complex AP-1, beta 1 subunit	4,74E+04	5,67E+04	5,49E+04	1,57E+05	1,60E+05	1,46E+05
gi 19424312	2	122	7,16E-03	2,88	HG	KH-type splicing regulatory protein	2,85E+04	2,11E+04	2,41E+04	6,89E+04	5,29E+04	9,07E+04
gi 62339335	3	208	2,59E-03	2,87	HG	immunoglobulin superfamily, member 8	1,07E+05	9,43E+04	1,03E+05	3,04E+05	2,27E+05	3,42E+05
gi 16758224	2	73	1,05E-03	2,86	HG	neurabin 1	7,90E+03	9,08E+03	8,92E+03	2,49E+04	2,07E+04	2,84E+04
gi 8850229	12	704	1,25E-02	2,84	HG	microtubule-associated protein 6	1,18E+06	1,06E+06	1,09E+06	3,58E+06	2,00E+06	3,88E+06
gi 18034787	4	162	1,67E-04	2,82	HG	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	5,79E+04	7,52E+04	8,31E+04	1,98E+05	1,91E+05	2,20E+05
gi 18093102; g	13	638	2,45E-03	2,76	HG	dynamitin 1	9,92E+05	9,62E+05	1,05E+06	2,64E+06	2,30E+06	3,36E+06
gi 16758748	2	85	2,32E-02	2,76	HG	dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide 2	1,16E+04	8,57E+03	1,06E+04	2,81E+04	1,76E+04	3,94E+04
gi 16758808	5	258	1,08E-03	2,74	HG	erythrocyte protein band 4.1-like 3	8,25E+04	1,12E+05	1,23E+05	3,08E+05	3,16E+05	2,43E+05
gi 76880457	2	73	2,34E-03	2,74	HG	protein kinase C, beta	1,88E+04	1,19E+04	1,10E+04	3,33E+04	3,61E+04	4,48E+04
gi 46048609	2	98	1,83E-02	2,73	HG	beta-catenin	2,95E+04	2,58E+04	2,28E+04	4,65E+04	7,02E+04	9,66E+04
gi 13591908	5	274	4,33E-03	2,73	HG	adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	7,62E+04	7,06E+04	7,94E+04	2,22E+05	2,42E+05	1,53E+05
gi 13591936	6	357	1,03E-02	2,63	HG	drebrin 1	1,21E+05	1,65E+05	1,74E+05	5,09E+05	2,84E+05	4,14E+05
gi 109464352	2	80	1,45E-02	2,61	HG	PREDICTED: similar to Kinesin-like protein KIF2 (Kinesin-2) (HK2)	4,04E+03	3,19E+03	4,39E+03	1,05E+04	6,74E+03	1,31E+04
gi 31543464	5	251	4,04E-03	2,61	HG	Pyruvate carboxylase	8,71E+04	2,24E+05	9,95E+04	3,43E+05	3,77E+05	3,51E+05
gi 6981600	6	399	1,82E-03	2,55	HG	syntaxin 1B2	4,84E+05	6,52E+05	6,18E+05	1,76E+06	1,42E+06	1,29E+06
gi 46485440	4	222	6,86E-03	2,51	HG	glucose phosphate isomerase	5,78E+04	4,43E+04	4,24E+04	9,44E+04	1,52E+05	1,17E+05
gi 6981248	3	92	1,68E-04	2,50	HG	nucleolin	2,44E+04	2,84E+04	2,80E+04	6,40E+04	6,43E+04	7,41E+04
gi 6978599	5	198	2,99E-03	2,49	HG	Ca<2+-dependent activator protein for secretion	2,98E+04	3,83E+04	3,60E+04	7,03E+04	1,03E+05	8,59E+04
gi 78365244	2	109	1,96E-02	2,47	HG	adducin 1 (alpha)	5,63E+04	4,56E+04	5,07E+04	9,84E+04	1,04E+05	1,75E+05
gi 109492754	2	71	8,04E-03	2,47	HG	PREDICTED: similar to immunoglobulin superfamily, member 4D	1,24E+05	1,15E+05	1,23E+05	3,43E+05	2,10E+05	3,43E+05
gi 8393823	14	642	1,07E-03	2,45	HG	neurofilament 3, medium	3,99E+05	5,68E+05	5,83E+05	1,19E+06	1,17E+06	1,44E+06
gi 13489067	2	98	8,54E-03	2,43	HG	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein	1,12E+05	6,37E+04	5,36E+04	1,74E+05	1,56E+05	2,27E+05
gi 13027458	2	123	7,63E-03	2,38	HG	vesicle-associated calmodulin-binding protein	4,35E+04	3,97E+04	4,47E+04	1,14E+05	7,29E+04	1,18E+05
gi 32189355	2	82	5,00E-03	2,35	HG	solute carrier family 25, member 4	1,48E+05	1,06E+05	1,09E+05	2,33E+05	3,45E+05	2,73E+05
gi 9507073	6	285	1,80E-03	2,34	HG	stromal cell derived factor receptor 1	2,04E+05	1,71E+05	1,81E+05	3,55E+05	4,78E+05	4,68E+05
gi 19705431	4	330	1,21E-02	2,33	HG	albumin	7,84E+05	6,95E+05	6,03E+05	1,41E+06	1,32E+06	2,13E+06
gi 48675867	2	73	1,17E-03	2,32	HG	ER transmembrane protein Dri 42	1,36E+04	1,76E+04	1,29E+04	2,95E+04	3,77E+04	3,51E+04
gi 9506891	4	234	2,06E-05	2,32	HG	solute carrier family 3, member 2	4,95E+04	4,57E+04	4,37E+04	1,05E+05	1,12E+05	1,04E+05

gi 57977273	3	148	1,04E-04	2,31	HG	phosphofructokinase, platelet	4,20E+04	3,27E+04	3,31E+04	8,16E+04	8,70E+04	8,04E+04
gi 8393024	3	170	3,27E-02	2,31	HG	complement component 3	1,09E+05	1,01E+05	1,08E+05	1,91E+05	1,89E+05	3,55E+05
gi 78365255	2	89	3,82E-02	2,15	HG	dihydropyrimidinase	1,08E+05	9,46E+04	1,01E+05	1,87E+05	1,51E+05	3,12E+05
gi 19424156	2	85	2,21E-02	2,13	HG	A-kinase anchor protein 5	9,82E+03	1,29E+04	1,29E+04	3,36E+04	1,81E+04	2,42E+04
gi 11120682	2	99	9,06E-03	2,12	HG	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta subunit	1,93E+05	1,61E+05	1,63E+05	3,30E+05	3,05E+05	4,63E+05
gi 13994177	3	331	7,55E-03	2,10	HG	synaptosomal-associated protein, 91kDa homolog	1,02E+05	1,43E+05	1,50E+05	3,41E+05	2,46E+05	2,43E+05
gi 6981400	2	90	1,65E-02	2,05	HG	protein kinase C, gamma	9,47E+04	8,96E+04	8,29E+04	1,52E+05	1,56E+05	2,41E+05
gi 53850628	4	160	1,04E-02	2,03	HG	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa	1,09E+05	1,11E+05	1,14E+05	1,94E+05	1,95E+05	2,87E+05
gi 16758938	2	75	3,79E-02	2,01	HG	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	7,41E+04	5,41E+04	5,41E+04	8,39E+04	1,14E+05	1,69E+05
gi 34861256	2	130	4,52E-03	1,97	HFD	PREDICTED: similar to toll interacting protein	1,27E+05	1,58E+05	1,41E+05	9,32E+04	7,01E+04	5,33E+04
gi 77627971	4	186	5,63E-03	2,02	HFD	phosphoglucomutase 1	6,84E+04	6,75E+04	6,82E+04	1,91E+04	4,55E+04	3,63E+04
gi 13786204	4	259	2,06E-02	2,04	HFD	voltage-dependent anion channel 3	2,74E+05	1,78E+05	2,68E+05	1,05E+05	7,82E+04	1,69E+05
gi 13592037	2	147	4,01E-03	2,04	HFD	RAB3B, member RAS oncogene family	5,12E+04	6,86E+04	5,98E+04	2,73E+04	3,65E+04	2,42E+04
gi 16758404	2	108	3,31E-02	2,04	HFD	peroxiredoxin 5 precursor	1,66E+05	1,56E+05	1,60E+05	9,38E+04	1,26E+05	1,61E+04
gi 13786200	6	504	3,66E-03	2,05	HFD	voltage-dependent anion channel 1	4,46E+06	3,92E+06	4,82E+06	1,66E+06	1,92E+06	2,86E+06
gi 25453412	2	222	2,04E-02	2,05	HFD	glutathione S-transferase, pi 2	5,14E+05	6,44E+05	6,18E+05	1,56E+05	2,39E+05	4,70E+05
gi 55742725	4	211	4,56E-03	2,06	HFD	dihydropyrimidinase	2,10E+05	2,37E+05	2,41E+05	7,46E+04	1,07E+05	1,54E+05
gi 76253866	4	168	1,17E-03	2,06	HFD	synaptotagmin 1	6,75E+05	5,80E+05	6,68E+05	2,37E+05	3,56E+05	3,39E+05
gi 13928824	5	332	9,62E-03	2,09	HFD	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	6,87E+05	9,93E+05	1,04E+06	3,47E+05	5,41E+05	4,15E+05
gi 77404215	2	103	6,65E-03	2,15	HFD	synuclein, beta	1,17E+06	1,10E+06	1,15E+06	2,46E+05	6,48E+05	6,95E+05
gi 61098212	4	244	1,68E-02	2,16	HFD	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	3,22E+06	3,28E+06	3,24E+06	2,03E+06	2,07E+06	4,05E+05
gi 8393752	2	155	1,00E-02	2,17	HFD	microtubule-associated protein tau	6,07E+05	5,51E+05	5,89E+05	4,30E+05	1,64E+05	2,12E+05
gi 60678254	4	153	5,93E-03	2,19	HFD	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	1,27E+06	1,01E+06	1,05E+06	5,04E+05	7,02E+05	3,18E+05
gi 39930503	2	55	1,32E-02	2,22	HFD	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma subunit	1,09E+05	1,82E+05	1,54E+05	4,67E+04	8,12E+04	7,25E+04
gi 62657092	2	88	2,45E-02	2,23	HFD	PREDICTED: similar to Dual specificity protein phosphatase 3 (T-DSP11)	3,25E+04	3,02E+04	2,95E+04	1,29E+04	2,46E+04	3,94E+03
gi 62661722	5	284	6,49E-03	2,24	HFD	PREDICTED: similar to succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit	2,33E+05	2,81E+05	2,95E+05	9,20E+04	9,01E+04	1,80E+05
gi 59709467	3	199	1,83E-02	2,24	HFD	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	1,16E+05	1,38E+05	1,41E+05	4,80E+04	2,67E+04	1,01E+05
gi 34879019	2	133	8,07E-03	2,26	HFD	PREDICTED: similar to Protein NipSnap1	1,29E+05	1,24E+05	1,50E+05	5,44E+04	3,30E+04	9,11E+04
gi 9507243	4	184	9,54E-03	2,27	HFD	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	3,95E+05	4,27E+05	4,84E+05	3,09E+05	1,39E+05	1,28E+05
gi 34878862	3	175	1,27E-03	2,27	HFD	PREDICTED: similar to Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded D	1,50E+05	1,60E+05	1,69E+05	4,63E+04	8,42E+04	8,11E+04
gi 16758368	5	263	2,28E-03	2,29	HFD	RAB14, member RAS oncogene family	3,43E+05	3,76E+05	3,55E+05	2,08E+05	1,69E+05	9,33E+04
gi 61556754	3	302	2,57E-03	2,29	HFD	B-cell receptor-associated protein 37	2,83E+05	3,76E+05	3,61E+05	1,59E+05	1,75E+05	1,12E+05
gi 109503592	4	186	2,09E-03	2,29	HFD	PREDICTED: similar to Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, somatic form, mit	5,60E+05	5,97E+05	5,51E+05	2,52E+05	3,38E+05	1,55E+05
gi 11177888	2	70	1,60E-02	2,31	HFD	lin-7 homolog C	1,54E+04	1,58E+04	1,83E+04	6,05E+03	1,24E+04	3,02E+03
gi 61889115	2	95	1,09E-03	2,36	HFD	phosphoserine aminotransferase 1	6,89E+04	8,50E+04	8,31E+04	2,57E+04	3,91E+04	3,57E+04
gi 9506411	2	72	3,10E-02	2,39	HFD	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	8,82E+04	8,57E+04	1,08E+05	7,91E+04	2,40E+04	1,50E+04
gi 13786202	5	213	3,53E-03	2,40	HFD	voltage-dependent anion channel 2	1,18E+06	1,20E+06	1,22E+06	5,57E+05	7,05E+05	2,40E+05
gi 13591882	3	237	7,48E-05	2,41	HFD	synaptosomal-associated protein 25	5,98E+05	6,28E+05	6,06E+05	2,07E+05	2,82E+05	2,73E+05
gi 56090293	6	434	3,43E-03	2,42	HFD	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	1,23E+06	1,78E+06	1,69E+06	7,16E+05	6,80E+05	5,41E+05
gi 51948476	6	351	5,21E-04	2,45	HFD	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	4,35E+05	4,20E+05	4,25E+05	1,83E+05	2,20E+05	1,19E+05
gi 16758446	2	90	5,09E-04	2,46	HFD	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	7,72E+05	9,29E+05	9,23E+05	2,94E+05	3,69E+05	4,04E+05
gi 109475694	4	191	2,86E-04	2,49	HFD	PREDICTED: similar to succinate dehydrogenase Ip subunit	1,78E+05	1,96E+05	1,95E+05	7,35E+04	9,42E+04	6,08E+04
gi 109460227	5	286	1,28E-03	2,51	HFD	PREDICTED: similar to Alpha-centractin (Centractin) (Centrosome-associated actin homolog) (Ac	3,81E+05	3,74E+05	4,12E+05	1,33E+05	2,20E+05	1,13E+05
gi 77404242	5	238	6,17E-04	2,54	HFD	synapsin 2 isoform 1	3,98E+05	3,19E+05	3,93E+05	1,66E+05	1,38E+05	1,33E+05
gi 56605816	3	199	5,20E-03	2,54	HFD	similar to Ras-related protein Rab-1B	1,26E+05	1,56E+05	1,71E+05	2,96E+04	6,96E+04	7,89E+04
gi 6981614	2	125	1,07E-02	2,55	HFD	vesicle-associated membrane protein 2	1,89E+05	2,20E+05	2,35E+05	1,25E+05	1,09E+05	1,90E+04
gi 55926139	6	375	6,53E-03	2,60	HFD	alpha isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2	2,45E+05	3,05E+05	2,79E+05	5,73E+04	8,57E+04	1,76E+05
gi 12711692	3	118	9,38E-04	2,60	HFD	dihydropyrimidinase-like 5	1,11E+05	1,45E+05	1,20E+05	4,23E+04	4,81E+04	5,42E+04
gi 109501878	2	83	1,58E-03	2,63	HFD	PREDICTED: similar to esterase D/formylglutathione hydrolase	1,12E+05	9,88E+04	9,54E+04	4,89E+04	3,94E+04	2,50E+04
gi 42476045	2	59	7,80E-03	2,63	HFD	cathepsin D	5,47E+04	5,62E+04	4,31E+04	2,81E+04	2,41E+04	6,32E+03
gi 8393706	4	334	2,97E-04	2,67	HFD	lactate dehydrogenase A	1,52E+05	1,51E+05	1,40E+05	4,77E+04	7,24E+04	4,60E+04

gi 6981146	6	361	2,85E-03	2,69	HFD	lactate dehydrogenase B	2,42E+05	3,13E+05	2,89E+05	7,57E+04	8,27E+04	1,55E+05
gi 40538742	7	483	3,27E-03	2,70	HFD	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1.	1,21E+06	1,73E+06	1,71E+06	4,86E+05	5,10E+05	7,27E+05
gi 11560024	5	229	8,36E-04	2,71	HFD	heat shock protein 1 (chaperonin)	8,43E+05	1,08E+06	1,09E+06	4,23E+05	3,42E+05	3,46E+05
gi 34866853	2	88	1,64E-02	2,73	HFD	PREDICTED: similar to cytochrome c-1	2,76E+05	4,44E+05	3,80E+05	1,79E+05	1,96E+05	2,80E+04
gi 40786436	2	129	2,64E-02	2,75	HFD	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	1,64E+05	2,06E+05	2,05E+05	4,35E+04	1,53E+05	1,27E+04
gi 13929006	2	123	2,08E-03	2,77	HFD	RAB2, member RAS oncogene family	1,67E+05	1,40E+05	1,99E+05	7,33E+04	5,39E+04	5,57E+04
gi 109459775	2	76	7,45E-03	2,83	HFD	PREDICTED: similar to EH-domain-containing protein 1 (mPAST1)	1,50E+04	2,48E+04	1,86E+04	8,45E+03	7,37E+03	4,79E+03
gi 25742674	2	81	4,26E-03	2,83	HFD	ataxin 10 homolog	1,09E+04	1,49E+04	1,29E+04	7,13E+03	3,30E+03	3,25E+03
gi 48675845	2	223	4,82E-03	2,87	HFD	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	4,15E+04	5,91E+04	4,37E+04	1,01E+04	1,67E+04	2,34E+04
gi 11968132	2	160	9,60E-03	2,90	HFD	peroxiredoxin 3	1,69E+05	2,62E+05	2,10E+05	7,63E+04	1,16E+05	2,88E+04
gi 61889092	3	139	2,55E-03	2,97	HFD	adenylate kinase 1	3,15E+05	3,80E+05	3,06E+05	1,48E+05	1,41E+05	4,83E+04
gi 6978809	6	370	1,25E-03	2,97	HFD	enolase 1, alpha	1,19E+06	1,48E+06	1,63E+06	5,55E+05	5,31E+05	3,64E+05
gi 8394069	2	175	6,17E-03	2,97	HFD	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4	3,45E+04	4,16E+04	3,75E+04	1,39E+04	2,15E+04	2,85E+03
gi 62656166	2	54	6,94E-03	3,03	HFD	PREDICTED: similar to target of myb1-like 2 isoform 2	7,02E+04	1,02E+05	1,10E+05	4,84E+04	2,63E+04	1,81E+04
gi 15100179	4	252	1,21E-02	3,05	HFD	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	1,34E+06	2,12E+06	1,83E+06	5,39E+05	1,02E+06	1,72E+05
gi 62665041	2	102	8,38E-03	3,18	HFD	PREDICTED: similar to cAMP-dependent protein kinase, alpha-catalytic subunit (PKA C-alpha)	1,32E+04	1,66E+04	1,77E+04	2,54E+03	9,72E+03	2,65E+03
gi 16758742	2	96	1,54E-03	3,20	HFD	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2	2,26E+04	2,11E+04	2,43E+04	8,57E+03	1,00E+04	2,64E+03
gi 9506519	2	108	2,18E-03	3,21	HFD	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	1,33E+05	1,02E+05	1,04E+05	3,82E+04	4,86E+04	1,86E+04
gi 8394009	5	279	3,61E-03	3,23	HFD	peptidylprolyl isomerase A	4,14E+06	4,10E+06	3,60E+06	1,92E+06	1,52E+06	2,29E+05
gi 21245098	3	129	7,39E-04	3,25	HFD	tubulin, beta 3	1,79E+06	2,07E+06	2,38E+06	5,90E+05	5,43E+05	7,90E+05
gi 109474252	2	141	2,79E-03	3,20	HFD	PREDICTED: similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9	3,72E+04	3,86E+04	2,52E+04	1,09E+04	1,09E+04	4,83E+03
gi 58865398	2	161	5,05E-03	3,38	HFD	leucine aminopeptidase 3	2,85E+04	3,93E+04	4,42E+04	1,69E+04	1,09E+04	5,33E+03
gi 12083663	2	80	2,70E-03	3,40	HFD	flotillin 1	1,19E+04	1,49E+04	1,77E+04	2,91E+03	4,11E+03	6,05E+03
gi 109464449	5	493	2,40E-04	3,50	HFD	PREDICTED: similar to 3-oxoacid CoA transferase 1	2,28E+05	2,26E+05	2,60E+05	9,20E+04	5,65E+04	5,53E+04
gi 26023949	7	432	2,29E-03	3,52	HFD	enolase 2, gamma	1,23E+06	1,74E+06	1,85E+06	5,45E+05	4,85E+05	3,41E+05
gi 32996721	3	160	1,15E-05	3,53	HFD	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 10-like protein	1,64E+05	1,63E+05	1,60E+05	3,99E+04	4,22E+04	5,61E+04
gi 62663437	5	311	2,83E-03	3,53	HFD	PREDICTED: similar to triosephosphate isomerase	2,12E+06	1,75E+06	2,06E+06	9,21E+05	6,44E+05	1,14E+05
gi 8393418	5	408	2,06E-03	3,63	HFD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6,20E+06	6,97E+06	9,11E+06	2,38E+06	1,51E+06	2,24E+06
gi 18959246	2	70	7,95E-04	3,70	HFD	adaptor-related protein complex 3, mu 2 subunit	9,93E+03	1,34E+04	1,09E+04	3,05E+03	3,65E+03	2,56E+03
gi 8393910	4	225	6,21E-03	3,83	HFD	phosphatidylethanolamine binding protein	2,66E+06	1,81E+06	2,90E+06	1,14E+06	5,13E+05	2,69E+05
gi 14389299	2	88	2,55E-03	3,87	HFD	vimentin	8,86E+04	1,12E+05	1,00E+05	3,69E+04	3,80E+04	2,96E+03
gi 109484025	2	92	1,82E-03	3,94	HFD	PREDICTED: similar to glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	1,80E+04	2,64E+04	2,49E+04	5,52E+03	7,90E+03	4,19E+03
gi 109460535	2	65	6,00E-03	3,95	HFD	PREDICTED: NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6	1,48E+05	2,41E+05	2,65E+05	7,03E+04	6,04E+04	3,51E+04
gi 109504787	2	109	1,95E-03	3,96	HFD	PREDICTED: similar to tubulin, beta 2	1,13E+06	1,32E+06	8,62E+05	2,48E+05	2,28E+05	3,59E+05
gi 6978487	3	210	8,73E-04	3,99	HFD	aldolase A	1,20E+06	1,63E+06	1,36E+06	2,23E+05	4,43E+05	3,87E+05
gi 50233797	2	79	2,56E-03	4,02	HFD	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	2,61E+04	2,04E+04	1,68E+04	3,86E+03	4,89E+03	6,98E+03
gi 38454230	4	247	7,34E-04	4,08	HFD	vacuolar H+ ATPase E1	2,00E+05	2,07E+05	2,07E+05	2,98E+04	8,97E+04	3,14E+04
gi 55741544	3	232	6,48E-04	4,09	HFD	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	2,10E+05	2,80E+05	2,40E+05	4,71E+04	8,02E+04	5,14E+04
gi 6981462	2	97	5,08E-04	4,09	HFD	acyl-CoA hydrolase	6,39E+04	6,66E+04	5,83E+04	1,53E+04	2,41E+04	6,80E+03
gi 62990183	3	267	3,02E-03	4,18	HFD	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	5,14E+05	8,31E+05	7,60E+05	1,59E+05	2,24E+05	1,20E+05
gi 16757984	2	81	2,33E-02	4,20	HFD	phosphoglycerate mutase 1	4,56E+05	2,28E+05	4,49E+05	2,26E+05	1,81E+04	2,50E+04
gi 11693172	2	97	1,36E-02	4,23	HFD	calreticulin	3,01E+05	1,84E+05	4,03E+05	1,10E+05	4,53E+04	5,46E+04
gi 40018616	2	145	4,57E-03	4,25	HFD	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	8,32E+04	1,25E+05	1,00E+05	1,79E+04	4,63E+04	8,49E+03
gi 109486585	3	234	4,41E-03	4,45	HFD	PREDICTED: similar to tubulin, beta 4	7,96E+05	1,37E+06	1,37E+06	2,88E+05	2,57E+05	2,49E+05
gi 25282395	3	113	4,02E-03	4,65	HFD	glutathione-S-transferase, mu 5	3,64E+04	4,72E+04	5,68E+04	1,64E+04	1,26E+04	1,10E+03
gi 8394018	5	250	2,16E-03	4,72	HFD	protein phosphatase 2a, catalytic subunit, alpha isoform	4,60E+05	6,58E+05	5,03E+05	7,07E+04	1,98E+05	7,49E+04
gi 6981388	2	154	3,15E-03	4,76	HFD	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta	3,32E+04	4,95E+04	3,20E+04	9,87E+03	7,99E+03	6,23E+03
gi 29789261	5	262	1,50E-03	4,76	HFD	guanine nucleotide-binding protein, beta 2	4,01E+05	4,20E+05	5,69E+05	1,27E+05	1,08E+05	5,73E+04
gi 13929094	2	213	2,17E-04	4,81	HFD	guanine deaminase	1,14E+05	1,42E+05	1,31E+05	3,35E+04	2,96E+04	1,72E+04
gi 16758910	2	61	9,53E-04	4,95	HFD	alpha isoform of regulatory subunit B55, protein phosphatase 2	3,52E+04	4,74E+04	4,62E+04	3,70E+03	1,29E+04	9,45E+03
gi 8393896	2	69	7,40E-03	5,12	HFD	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	4,40E+05	3,94E+05	6,27E+05	2,22E+05	2,84E+04	3,47E+04

gi 16758202	2	87	1,11E-02	5,19	HFD	RAB27B, member RAS oncogene family	2,89E+03	4,62E+03	3,64E+03	1,21E+02	0,00E+00	2,03E+03
gi 6978441	2	163	1,35E-03	5,20	HFD	actin, gamma 2	3,73E+05	3,20E+05	4,73E+05	1,05E+05	6,41E+04	5,51E+04
gi 59891440	2	90	1,14E-03	5,63	HFD	non-POU domain containing, octamer-binding	3,98E+04	5,05E+04	4,58E+04	1,69E+04	3,27E+03	4,01E+03
gi 34328536	2	116	5,11E-03	5,81	HFD	single-stranded DNA binding protein 1	1,61E+04	3,09E+04	2,64E+04	4,91E+03	2,94E+03	4,79E+03
gi 62642969	3	126	7,69E-04	6,08	HFD	PREDICTED: similar to phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3	2,14E+04	2,17E+04	2,49E+04	1,57E+03	8,12E+03	1,49E+03
gi 56961620	3	153	3,90E-03	6,10	HFD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	2,76E+04	4,76E+04	4,13E+04	1,20E+04	2,56E+03	4,56E+03
gi 6981236	2	59	6,96E-04	6,36	HFD	myosin, heavy polypeptide 9	3,70E+05	5,28E+05	5,03E+05	8,75E+04	7,31E+04	5,97E+04
gi 16758810	2	70	9,64E-04	6,39	HFD	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (homologous to yeast UBC13)	2,53E+04	1,70E+04	2,21E+04	4,47E+03	2,19E+03	3,42E+03
gi 6981710	2	163	4,54E-06	6,47	HFD	tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, eta polypeptide	8,92E+04	8,79E+04	9,49E+04	1,15E+04	1,71E+04	1,34E+04
gi 62647260	3	171	1,22E-02	6,56	HFD	PREDICTED: similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1	6,63E+04	1,62E+05	1,21E+05	2,16E+04	2,23E+04	9,33E+03
gi 57977323	2	148	7,51E-04	6,65	HFD	cyclic nucleotide phosphodiesterase 1	1,31E+05	1,86E+05	1,81E+05	3,00E+04	1,43E+04	3,07E+04
gi 12018296	4	214	4,00E-03	7,35	HFD	septin 7	5,63E+04	9,77E+04	1,05E+05	9,05E+03	1,41E+04	1,20E+04
gi 77628000	2	104	1,33E-04	7,72	HFD	nitrilase family, member 2	3,42E+04	3,58E+04	4,06E+04	5,50E+03	7,49E+03	1,34E+03
gi 62664437	2	79	3,45E-04	8,01	HFD	PREDICTED: similar to aldehyde dehydrogenase family 7, member A1	6,45E+04	4,75E+04	6,20E+04	7,79E+03	7,99E+03	5,94E+03
gi 13928882	2	98	5,62E-03	8,34	HFD	sulfotransferase family 4A, member 1	8,79E+03	1,73E+04	1,23E+04	1,08E+03	2,51E+03	1,01E+03
gi 19424278	2	112	5,70E-04	8,36	HFD	N-myc downstream regulated gene 2	1,46E+05	1,81E+05	1,34E+05	3,41E+04	1,43E+04	6,62E+03
gi 13928808	3	164	7,94E-03	8,40	HFD	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3	2,34E+04	2,73E+04	4,63E+04	4,37E+03	3,89E+03	3,30E+03
gi 109496514	2	138	1,08E-03	8,54	HFD	PREDICTED: similar to Fascin (Singed-like protein) isoform 2	4,52E+04	6,85E+04	5,49E+04	4,02E+03	1,07E+04	5,07E+03
gi 8392971	2	114	3,55E-04	8,67	HFD	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	2,21E+04	2,88E+04	2,31E+04	1,46E+03	2,21E+03	4,86E+03
gi 16758698;gi	3	237	1,93E-04	9,00	HFD	mitogen activated protein kinase 1	8,30E+04	1,04E+05	1,04E+05	6,08E+03	1,79E+04	8,29E+03
gi 6978505	3	135	1,63E-03	9,23	HFD	annexin 5	3,05E+04	4,86E+04	4,04E+04	1,18E+03	8,29E+03	3,48E+03
gi 13994225	2	129	4,14E-04	11,12	HFD	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	2,32E+04	2,67E+04	3,03E+04	1,43E+03	5,78E+03	0,00E+00
gi 56605812	2	176	1,08E-02	11,22	HFD	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2	2,22E+04	5,49E+04	5,29E+04	8,16E+03	8,60E+02	2,57E+03
gi 16923986	2	73	2,77E-03	21,31	HFD	aplysia ras-related homolog A2	8,16E+03	1,41E+04	1,49E+04	1,37E+03	3,71E+02	0,00E+00
gi 72255527	2	125	1,70E-03	26,29	HFD	stomatin (Epb7.2)-like 2	3,14E+04	2,50E+04	4,18E+04	0,00E+00	3,74E+03	0,00E+00
gi 8394060	2	57	1,24E-03	27,98	HFD	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	1,12E+04	1,64E+04	1,08E+04	6,92E+02	3,29E+02	3,50E+02
gi 58865384	2	192	1,46E-02	89,61	HFD	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	1,08E+04	3,35E+04	3,51E+04	8,85E+02	0,00E+00	0,00E+00

Article scientifique



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap

Brain proteomic modifications associated to protective effect of grape extract in a murine model of obesity



Selima Smine^{a,b,e}, Antoine Obry^{b,c}, Safwen Kadri^a, Julie Hardouin^{b,c}, Manuel Fréret^d, Mohamed Amri^e, Thierry Jouenne^{b,c}, Ferid Limam^a, Pascal Cosette^{b,c,*}, Ezzedine Aouani^a

^a Laboratoire des Substances Bioactives, Centre de Biotechnologie, Technopole Borj-Cedria, Hammam-Lif, Tunisie

^b Laboratoire Polymères, Biopolymères, Membranes, UMR6270 CNRS, IRIB, Normandie Université, Mont Saint Aignan, France

^c Plateforme Protéomique PISSARO, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Normandie Université, Mont Saint Aignan, France

^d Laboratoire Physiopathologie et Biothérapie des Maladies Inflammatoires et Autoimmunes, UMR-S905, INSERM, IRIB, Normandie Université, Rouen, France

^e Université Tunis El Manar, Faculté des Sciences de Tunis, Laboratoire de Neurophysiologie et Pathologies Fonctionnelles, Tunis, Tunisie

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2016

Received in revised form 24 January 2017

Accepted 3 March 2017

Available online 06 March 2017

ABSTRACT

In recent years, the obesity epidemic has developed into a major health crisis worldwide. With current treatments limited to expensive, high-risk surgery and minimally efficacious pharmacotherapy, new therapeutic options are urgently needed to fight against this alarming trend. Though brain dysfunction has been studied linked to high fat diet (HFD) and grape seed and skin extract (GSSE) correction, the proteomic modifications linking the two effects on brain lipotoxicity are not well understood. To this end rats were exposed for 8 weeks to HFD treatment, to GSSE (500 mg/kg BW) and to binary mixture of HFD and GSSE to gain insight into the potential pathways altered with metabolic disease and the protection afforded by GSSE. Significant modifications of brain proteins were detected using mass spectrometry-based differential proteomics. These proteins were mainly related to oxidative stress, glycolysis and calcium signaling. Additionally, proteins involved in the cytoskeleton were also affected by HFD treatment. Interestingly, whether up- or down regulated protein abundances, GSSE corrected most of the disturbances of HFD treatment. These findings provide impetus for future therapeutic investigation on GSSE against other metabolic disorders.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is considered as a major public health problem. The number of obese (BMI > 30) and overweight (BMI > 25) is reaching at least epidemic, if not pandemic proportions worldwide [1]. Indeed, the world health organization reports that in 2008, more than 1.4 billion adults were overweight and more than 200 million men and nearly 300 million women were obese. For instance in the United States, more than one third of adults (34%) are obese [2]. In addition, obesity is growing dramatically both in developed and developing countries and childhood obesity is reaching frightening proportions [3]. Of utmost importance, obesity increases the risk for metabolic syndrome diseases including type 2 diabetes, hypertension, heart attack, stroke, musculoskeletal disorders, gastrointestinal problems and various types of cancer [4–6].

Obesity originates from a complex interaction of genetic, developmental, behavioral and environmental influences [7,8]. It results in an

excess storage of fat in the body to such an extent that it causes health disorders leading to increased morbidity and mortality. To control such a syndrome, prevention is the most urgent strategy, but for now, it does not produce satisfactory results in the long term [9]. Pharmacological treatment can also reveal essential once the pathology has already developed. However, current therapies have important limitations and achieve only moderate body weight reduction. Resorting to surgery is an alternative strategy but presents also many limitations as well as associated risks. In this context, as synthetic drugs fail to produce desired effects and even produce undesired side effects, the utilization of traditional and alternative medicines is fast gaining acceptance.

In this context, natural products should clinch a strategic position. As a promising example, polyphenols have been reported to procure several beneficial health effects by acting as antioxidant, anti-carcinogenic, cardio-protective and also neuro-protective agents [10]. In our laboratory, numerous studies have been dedicated to exemplify and understand the effect of a grape seed and skin extract (GSSE, rich in polyphenols) in relation to metabolic syndrome. In particular, we previously showed that GSSE prevents oxidative injury and the deleterious effects linked to HFD-induced cardiac dysfunction and abdominal fat deposition [11]. In addition, GSSE could be considered as a preventive agent since

* Corresponding author at: UMR6270 CNRS, Plateforme Protéomique PISSARO – IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.
E-mail address: pascal.cosette@univ-rouen.fr (P. Cosette).

it was able to attenuate brain lipotoxicity [12]. Not the least, the use of GSSE in various settings, either for humans or in animal models, even at tremendous dosage, was extraordinarily safe.

From there came the idea to assess the effect of GSSE treatment on obese rats because their body mass was significantly decreased in GSSE treated animals fed with HFD. In the present study, we designed a proteomic approach targeting the whole brain compartment to investigate the biological pathways induced by HFD, but also those governed by GSSE treatment. Thus, this study outlines the pathology of obesity with a focus on the contribution of cerebral proteomic-driven studies to elucidate the molecular mechanisms associated to obesity and the potential preventive effect of GSSE.

2. Material and methods

2.1. Study design

Our experimental approach involved a comparative quantitative proteomic analysis of brain samples from different rat groups that had undergone standard diet (SD), SD supplemented with GSSE (SG), high fat diet (HFD) and HFD supplemented with GSSE (HG) followed by detailed ontology and pathway analyses of proteins exhibiting significant differential abundances. At least, 3 distinct brain tissues (biological replicates) from each group of animals were isolated. Then, individual brain tissues were independently homogenized and analyzed using quantitative proteomic approach, i.e., a label free quantification using liquid nano-chromatography - mass spectrometry (nLC-MS). Dedicated bioinformatic tools (see below) were then used to analyze MS data and to establish the differentially expressed proteins (Fig. 1).

2.2. Reagents and diets

Grape seed and skin extract (GSSE) was obtained from *Vitis vinifera* subsp *vinifera* cv. Carignan from northern Tunisia. Waste winemaking was collected from Tardi cooperative winery (Ain Ghelal). Seeds were manually separated from skins, air dried and grounded separately with a coffee grinder (FP 3121, Moulinex) until a fine powder was obtained. Both powders were then mixed at a ratio of 50:50 on

dry weight basis in 10% ethanol (v/v) in the dark. After vigorous stirring and centrifugation at $10,730 \times g$ for 15 min at 4 °C, supernatant containing soluble polyphenols was daily administered to animals (for SG and HG).

Standard rodent chow in pellet form purchased from ALMAS (Bizerte, Tunisia) contained 3% fat, 40% carbohydrate and 14.5% protein. High Fat Diet (HFD) was prepared by soaking commercial food pellets into warmed and liquefied fat from animal origin (sheep) during 15 min and allowed to dry at room temperature. HFD contained 28% fat (fatty acid composition of HFD is given in Table 1), 32% carbohydrate and 11.6% protein.

2.3. Animals and experimental design

Wistar male rats (180–200 g, 2 months-old) from Pasteur Institute (Tunis) were used in agreement with the NIH guidelines [National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals vol. 20. National Institute of Health, Bethesda pp 85–123]. They were maintained in animal facility at a controlled temperature (22 ± 2 °C) with a 12 h light/dark cycle for 8 weeks and divided into 4 groups of animals each fed with either SD or HFD. Rats additionally received by daily i.p. injection either 10% ethanol as vehicle (control SD and HFD) or supplemented with high dosage GSSE of 500 mg/kg BW (SG and HG) at an injection volume of 1 ml/kg BW. At the end of the treatment, rats were killed by decapitation, their blood collected and plasma processed for lipid profiling and oxidative stress assessment. Brain tissues were also collected and stored at -80 °C until use.

2.4. Sample preparation

Whole brains were carefully dissected and lipids extracted according to Folch and collaborators [13] in view of lipid comparative analysis between the different conditions of diet. In parallel to lipid isolation, the protein fractions were also collected. Typically, brain tissues were frozen in liquid nitrogen and further homogenized in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, urea 7 M, thiourea 2 M, CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) 2%, C7Bz0 0.5%, DTT 20 mM) and 100 μ L of a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) were added. Then, the homogenates were sonicated for 90 s (15% amplitude for 3 cycles of 30 s each) and all the protein extraction steps were performed on ice.

After elimination of debris by centrifugation ($10,730 \times g$ for 20 min at 4 °C), supernatants were collected and submitted to a 2-D clean-up Kit (GE Healthcare) precipitation step to eliminate interfering compounds and protein concentration determined using the Bradford method [14].

2.5. Enzymatic digestion of whole protein extracts

30 μ g of proteins from rat brain samples were loaded on a 7% stacking polyacrylamide gel and after a short migration and staining, the proteins were cut out from the SDS PAGE gel just after they penetrated into the gel. The revealed gel bands were excised, immersed in a reductive medium containing 5 mM DTT and cysteines were then irreversibly

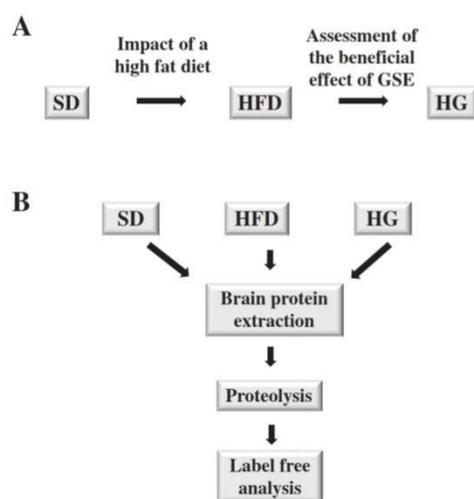


Fig. 1. Schematic representation of experimental design and objectives of the study (A). Brains were isolated from each condition (SD, HFD, and HG) and submitted to a protein extraction step. Brain protein extracts were digested using trypsin and the resulting peptides were analyzed using LC/MSMS with CID fragmentation on a LTQ-Orbitrap instrument. Thereafter, mass spectrometry data were processed by using dedicated bioinformatic tools for protein identification and quantitation (B).

Table 1
Fatty acid composition of HFD.

Fatty acid	Saturation	%
Myristic acid (C14:0)	SFA	47
Palmitic acid (C16:0)		24.7
Stearic acid (C18:0)		0.17
Palmitoleic acid (C16:1w-7)	MUFA	27
Oleic acid (C18:1w-7)		0.20
Linoleic acid (C18:2w-6)	PUFA	1.0

SFA: saturated fatty acid, MUFA: mono-unsaturated fatty acid, PUFA: poly-unsaturated fatty acid.

alkylated in 25 mM iodoacetamide. After extensive washing with water, protein-containing bands were submitted to trypsin digestion (0.5 µg per band, Promega). Several steps of peptide extraction were performed in H₂O/CH₃CN (1:1) solutions acidified with 0.1% TFA and finally for each sample, peptide extracts were combined and evaporated.

2.6. Liquid nano-chromatography and mass spectrometry

All experiments were realized with a hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer (LTQ-Orbitrap Elite, Thermo Scientific) equipped with a nano-ESI source and coupled to a liquid nano-chromatography system (Easy nLC II system, Thermo Scientific). For each sample, 1 µg was injected onto an enrichment column (C18 PepMap100, Thermo Scientific). The separation was achieved with an analytical column needle (NTCC-360/100-5-153, NikkyoTechnos, Japan). The mobile phase consisted of H₂O/0.1% formic acid (FA) (buffer A) and CH₃CN/0.1% FA (buffer B). Tryptic peptides were eluted at a flow rate of 300 nL/min using a three-step linear gradient: from 2 to 40% B over 95 min, from 40 to 80% B in 4 min and 11 min at 80% B.

The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with a capillary voltage and a source temperature set at 1.5 kV and 275 °C, respectively. The samples were analyzed using a CID (collision induced dissociation) fragmentation method with a collision energy of 35 eV. The first scan (MS spectra) was recorded in the orbitrap analyzer (R = 60,000) within a mass range *m/z* 400–2000. Then, the 20 most intense peptide ions were selected for MS² experiments. In addition, singly charged species were excluded for MS² analysis and dynamic exclusion of already fragmented precursor ions was applied for 30 s.

2.7. Database searches and protein identification

Raw data files were processed using Proteome Discoverer software (Version 1.3, Thermo Scientific). Peak lists were searched using the Mascot search engine (Version 2.2, Matrix Science) against the database Swiss Prot (V55.6; 390696 sequences) restricted to the taxonomy of *Rattus norvegicus*. Database searches were performed with the following parameters: precursor ion tolerance set at 10 ppm and fragment mass tolerance at 0.5 Da; 2 missed trypsin cleavage sites allowed and variable modifications: carbamido-methylation of cysteines and oxidation of methionines.

2.8. Relative quantification using Progenesis LC-MS

Raw data were imported in Progenesis LC-MS software (V4.0.4441.29989, Nonlinear Dynamics). After MS data conversion, a LC-MS run was set as a reference and the retention time of all other samples within experiments were aligned (15 manual landmarks followed by automatic alignment). Features with only one charge or more than 8 charges were excluded from further analyses. After alignment and feature exclusion, raw abundances of all features were normalized. Normalization resulted in a unique factor for each sample that corrected all features in the sample. Statistical analysis was performed using normalized abundances for one way analysis of variance (ANOVA) calculations of all remaining features. To be included in differential analysis, features should present *p*- and *q*-values <0.05. When present, MS/MS spectra from selected features were exported and used for peptide identification with identical search parameters as described above (see protein identification). At this point, all conflicting features were discarded for quantitation. All peptides allocated were included when presenting an identification score >20 (identity threshold in Mascot searches). The total cumulative abundances of each protein were obtained by summing the abundances of all retained peptides, with at least 2 peptides per protein to ensure adequate quantitation. A final filtering stage was applied at the protein level (*p*-value < 0.05).

2.9. Bioinformatics

Different bioinformatics tools were used for functional gene classification and pathways analysis of over- and under-represented proteins in the different comparisons (DAVID, KEGG and Ingenuity). These tools mainly provide batch gene annotation and gene ontology (GO) term enrichment analysis to highlight the most relevant GO terms associated with a given gene list. In addition, we mapped the protein presenting differential abundance into publicly available protein-protein interaction network using String [15].

2.10. Measurement of H₂O₂ level

Brain H₂O₂ level was determined enzymatically using a commercially available kit from Biomaghreb Tunisia according to the method outlined by Kakinuma and coworkers [16]. Briefly, in the presence of peroxidase, H₂O₂ reacts with 4-amino-antipyrine and phenol to give a red colored quinoneimine that absorbs at 505 nm. Results were expressed as mmol H₂O₂/mg protein.

2.11. Immunoblot analysis

Rat brain tissues were snap frozen in liquid nitrogen, grounded in a mortar, and homogenized in ice-cold lysis buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail. Homogenates were then centrifuged at 27,500 × *g* for 30 min at 4 °C and the protein concentration of supernatant was quantified using the Bradford assay. Lysates were further solubilized in NuPAGE lithium dodecyl sulfate sample buffer (Invitrogen). Protein extracts (10 to 20 µg) were loaded and resolved on 12% SDS-PAGE. After electrophoretic separation at 200 V for 1 h, proteins were transferred to a PVDF membrane (Trans-Blot; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) at 30 V for 90 min. Membranes were then incubated in a blocking buffer (Odyssey; Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) with PBS containing 0.1% Tween and then with one of the following antibodies: mouse anti-Eno1 (Stressgen; Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY), rabbit anti-PPARγ (LifeSpanBioSciences Inc., Seattle, WA), goat anti-VDAC (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-GAPDH (Sigma-Aldrich). After washing with an appropriate Alexa Fluor 680-labeled secondary antibody (Invitrogen), membranes were scanned using a Li-Cor scanner (Odyssey) to allow quantitation. The value assigned to the standard diet condition (SD) was used as a relative reference for the other samples.

2.12. Measurement of brain calcium and calpain activity

Ionizable Ca²⁺ was measured according to the method outlined by Stern and Lewis [17] using a commercial kit (Biomaghreb, Tunisia). At basic pH, Ca²⁺ forms with cresolphthalein a purple complex, allowing absorbance measurement at 570 nm. Briefly, 50 µL of brain homogenate were incubated with 650 µL of a reaction mixture containing 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer, cresolphthalein and hydroxy-8 quinoleine at room temperature for 5 min.

Calpain activity (E.C.3.4.22.52) was measured according to the method outlined by Sasaki and coworkers [18] using the fluorogenic substrate *N*-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (*N*-succinyl-Leu-Tyr AMC, Sigma). Brain homogenates (100 µg protein) were pre-incubated at 37 °C in a buffer containing 63 mM imidazole-HCl (pH 7.3), 10 mM β-mercaptoethanol and 5 mM CaCl₂ for 10 min. The fluorogenic substrate (200 µM) was added and the change in fluorescence (380 nm excitation/460 nm emission) was monitored for 40 min using a Bio-Tek FLX-800 microplate reader. The non-calcium-dependent fluorescence was measured under the same conditions without calcium, but in the presence of 1 mM EDTA and 10 mM EGTA. Calcium dependent cleavage activity towards *N*-succinyl-Leu-Tyr-AMC was reported as change in fluorescence per min per mg protein.

2.13. Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate and data are expressed as mean \pm SD, unless otherwise specified. One Way Analysis of Variance (One Way ANOVA) was systematically performed to infer statistical significance to the different sets of results. (p -values; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$) and performed using Statistica V5.1 (Statsoft). Graphics were additionally generated using Sigma plot V10 (Systat Software Inc).

For protein identification, FDR were measured using a decoy database approach after applying an identity threshold filtering step using Mascot. For protein quantification, p - and q -value filtering was applied at the feature/peptide level and an additional p -value filtering was applied at the protein level.

3. Results

3.1. Working hypothesis and experimental design

Preliminary results from previous studies indicated the effect of HFD on body weight gain, intra-abdominal fat deposition [11] and brain

lipotoxicity [12]. Interestingly high dosage GSSE, which was extraordinarily safe, counteracted most of the deleterious effects of HFD treatment [12].

Our original experimental design involved a comparative quantitative proteomic analysis [19] of brain samples from rats that were exposed to SD or HFD, with or without GSSE supplementation (Fig. 1), followed by detailed ontology and pathway analyses of proteins showing significant differential abundance.

For proteomic analysis, depending on the nature of the biological question raised, either biomarker detection or deciphering the understanding of a biological mechanism, statistical treatment during quantitation can be relaxed. For biomarker discovery, that need to highlight a few proteins with a high fold change of high robustness, obviously p -value but also q -value and power need to be used for filtering. For the comprehensive integration of a biological response, the situation and the treatment may be different. Here, we applied p -value and q -value filtering stages at the peptide level and an additional p -value filtering stage at the protein level, certainly associated to a slightly higher rate of false positive. However, this strategy was restricted to the interpretation of biological pathways when numerous proteins of a given pathway were found.

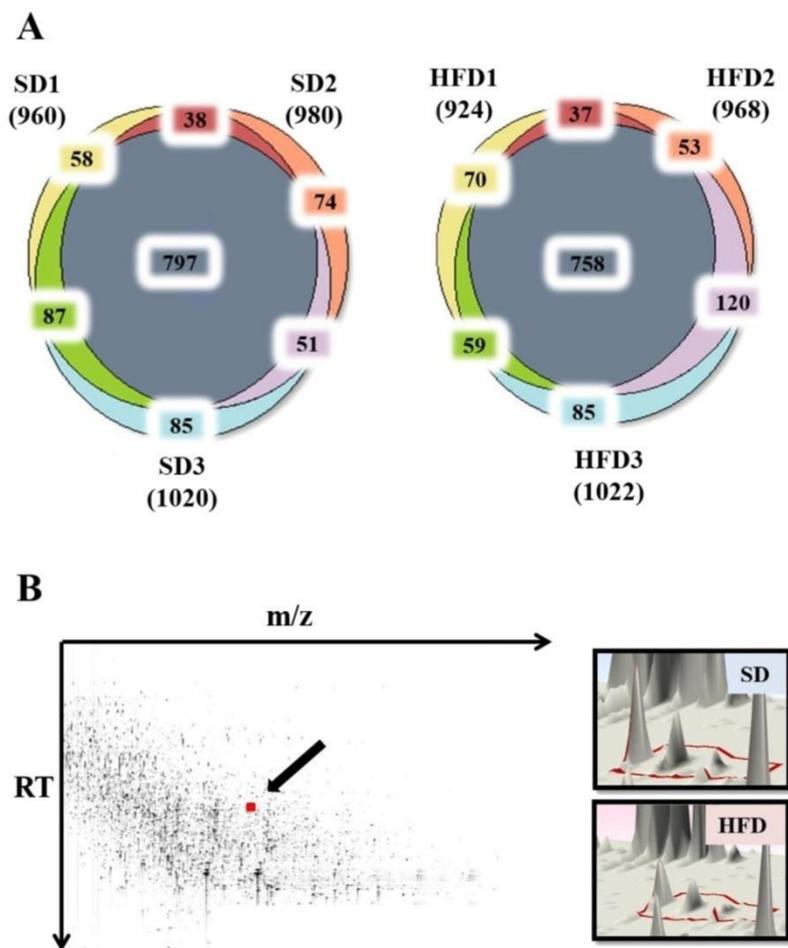


Fig. 2. Venn diagram summarizing identifications between biological replicates of SD and HFD and example of peptide quantification. (A) Venn diagrams showing the proteins identified from each replicate and the overlap between biological replicates. (B) Typical 2D LC/MS peptide map displaying the overall chromatographic quality for a given sample (right part). Comparison of the isotopic profile for a triply charged peptide ion corresponding to m/z 416.519 between SD and HFD brain samples (left part). The corresponding fragmentation spectrum allowed identification of the peptide "YFENWSASMI" (Mascot peptide ion score of 120) from cytochrome c oxidase.

3.2. Incidence of HFD on brain protein pattern

As a first step, we analyzed the rat brain proteins altered by HFD compared to SD. To assess the reproducibility of our approach, three biological replicates of each condition were compared. The Venn diagram illustrates the number of identified proteins in each biological replicate of SD and the overlap between the replicates (Fig. 2A). A total of 980, 960 and 1020 proteins were obtained from the 3 different datasets, and combining all three datasets, 1190 proteins were identified, among which 797 (66.97%) were common between all three SD datasets. The number of overlapping proteins between datasets 1 and 2, datasets 2 and 3, and datasets 1 and 3 were 884, 835 and 848 respectively. The percentage of identification in only one replicate totaled 18.23%.

The same diagram was made for the three replicates of brains from HFD treated rats and 924, 968 and 1022 proteins in the three datasets were obtained respectively (Fig. 2A). A number of 758 proteins (64.12%) were common to the three HFD datasets from a total of 1182 identified proteins in the HFD condition. The percentage of protein identification from only one replicate totaled 17.58%.

3.2.1. Identification of proteins segregating SD and HFD rat brain samples

The term “differential proteomics” refers to changes in protein abundance that occurred between two distinct states. Identification of proteins presenting differential abundances is a multi-stage process,

involving computer-aided normalization, followed by measurement and comparison of the relative intensities of each protein. Applying these parameters, peptide ion intensities from LC–MS maps were compared in the various conditions. A typical event for this scenario is presented with the example of a peptide belonging to the cytochrome-c-oxidase sequence (Fig. 2B).

When comparing SD and HFD maps according to this strategy, 328 peptides were considered, allowing the identification of 37 proteins that were associated to significant changes, with 15 proteins up-regulated and 22 proteins down-regulated upon exposure to HFD (results summarized in Table 2). Among these regulated proteins, Eno1 and Eno2 (isoforms α and γ of enolase) were accumulated in the HFD group. Another protein in the same profile is Map2 (microtubule-associated protein 2) whose quantitation relies on a large number of peptides and a p-value <0.001 (see case examples in Supplementary Fig. 1). In contrast, YwhaQ (also known as 14-3-3 protein theta, involved in the regulation of a large spectrum of signaling pathways) and Dnajc5 (a chaperone involved in neuronal function) were down-regulated proteins in HFD rat brains, and associated to the most statistically significant p-values (0.0006 and 0.0001, respectively).

3.2.2. Functional pathways impacted by HFD

Thereafter, an unsupervised classification was constructed by using the relative abundance values (SD and HFD) extracted for each of the 37 regulated proteins (Fig. 3A). The significantly differentiated proteins

Table 2

Identification of the 37 rat brain proteins showing differential abundance between standard diet (SD) and high fat diet (HFD).

Uniprot ID	Annotation	Description	# peptides ^a	Score ^b	Protein ANOVA (p-Value)	SD/HFD ratio
Proteins accumulated in rat brain from animals exposed to HFD						
P06686	Atp1a2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	2	79	2.34E-02	0.52
P11506	Atp2b2	ATPase, Ca ²⁺ transporting, plasma membrane 2	3	170	3.55E-04	0.49
Q05175	Basp1	Brain abundant, membrane attached signal protein 1	2	89	1.24E-02	0.47
Q62717	Cadps	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion	2	104	1.98E-02	0.62
O88778	Bsn	Bassoon protein	2	103	1.25E-02	0.55
P48721	Hspa9	PREDICTED: similar to Stress-70 protein, mitochondrial precursor	2	80	2.80E-02	0.64
P64715	Map2	Microtubule-associated protein 2	7	331	3.41E-04	0.70
P31662	Slc6a17	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	2	105	4.19E-02	0.62
O70351	Hsd17b10	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	3	178	2.09E-02	0.73
Q9JK11	Rtn4	Reticulon 4	2	97	2.44E-03	0.73
P04764	Eno1	Enolase 1, alpha	3	208	4.84E-04	0.72
Q9Z2L0	Vdac1	Voltage-dependent anion channel 1	2	142	6.46E-03	0.75
P13084	Npm1	Nucleophosmin 1	2	84	6.17E-03	0.80
P10719	Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta subunit	2	111	3.44E-03	0.81
P07323	Eno2	Enolase 2, gamma	3	262	1.37E-02	0.86
Proteins accumulated in rat brain from animals exposed to SD						
P60881	Snap25	Synaptosomal-associated protein 25	3	98	2.33E-02	1.18
P04797	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	73	4.34E-02	1.22
P53534	Pygb	PREDICTED: similar to Glycogen phosphorylase, brain form	2	83	1.77E-02	1.20
P00406	Mtco2	Cytochrome c oxidase subunit II	3	121	1.38E-02	1.33
Q66HA8	Hsph1	Heat shock 105 kDa/110 kDa protein 1	2	93	2.65E-02	1.27
O70351	Opa1	RN protein	2	64	5.16E-03	1.32
Q64428	Hadha	Mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit	2	72	3.79E-02	1.47
Q5XIH3	Ndufv1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51 kDa	2	103	6.24E-03	1.34
Q5EEy3	Gnai2	Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2	2	86	9.31E-03	1.34
Q63092	Camkv	Vesicle-associated calmodulin-binding protein	2	76	2.80E-02	1.39
P68255	Ywhaq	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	2	124	6.37E-04	1.43
P35571	Gpd2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	2	80	5.79E-03	1.47
Q5X134	Ppp2r1a	Alpha isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2	3	104	8.94E-03	1.51
P02680	Fgg	Fibrinogen, gamma polypeptide	2	71	9.98E-03	1.55
Q9Z1P2	Actn1	Actinin, alpha 1	3	118	6.56E-03	1.70
P06399	Fga	Fibrinogen, alpha polypeptide	2	126	7.99E-03	1.76
P02688	Mbp	Myelin basic protein isoform 1	4	184	2.48E-02	1.46
P60905	Dnajc5	Cysteine string protein	3	152	1.08E-04	1.71
MORBL8	Tceal6	PREDICTED: similar to transcription elongation factor A (SII)-like 3	2	59	3.96E-02	1.91
Q63633	Slc12a5	Solute carrier family 12 member 5	2	118	9.22E-03	1.91
B1WC34	Prkcsb	PREDICTED: similar to Glucosidase II beta subunit precursor	2	88	2.87E-02	2.30
Q6RKB3	Ncam2	Neural cell adhesion molecule 2	2	84	5.58E-03	2.16

^a Number of peptides that allowed protein quantitation.

^b Score from protein identification using Mascot.

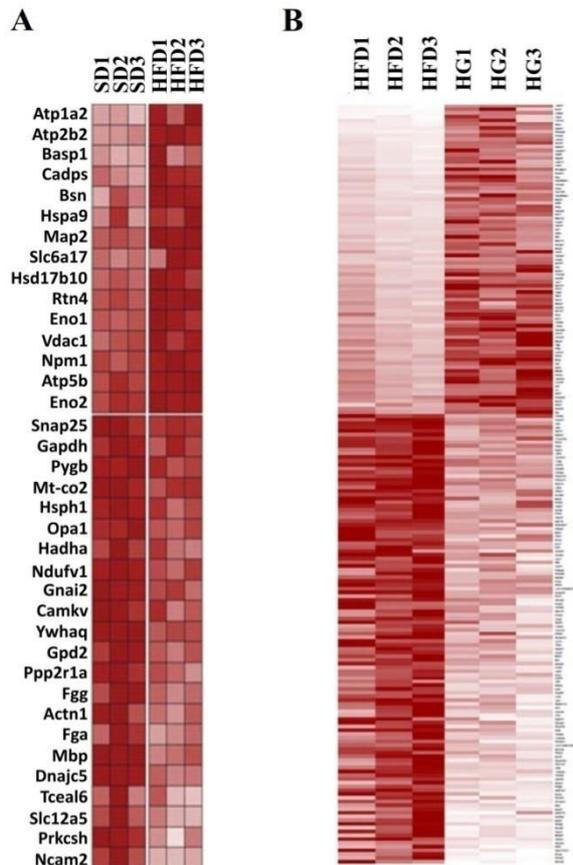


Fig. 3. Extent of protein abundance changes in the different comparisons. (A) Heat map showing differentially regulated proteins in rat brain samples between SD and HFD conditions. Lines represent the 37 proteins that display statistically significant changes in abundance. (B) Heat map showing differentially regulated proteins in rat brain samples between HFD and HG conditions (see Supplementary Table 1 for detail of proteins identification and fold change). The dynamic range of protein levels appears as different intensities of red (from absence in white to major intensities in dark red, 10 gradations).

between SD and HFD were classified according to their implication in a given biological process. With respect to this classification, oxidative phosphorylation (OXPHOS), calcium homeostasis and hypoxia inducible factor (HIF) signaling were the mainly affected pathways including up-regulated proteins in HFD rat brains (exemplified with the case of calcium signaling in Fig. 5A, see Supplementary Figs. 2A and 3A for OXPHOS and HIF signaling).

First, several proteins recruited in mitochondrial energy metabolism (Atp1a2, Atp2b2, Ndufv1, Mtco2) exhibited differential abundance ($p < 0.05$) between HFD and SD brain tissues (Table 2). These data highlighted both up- and down-regulation of key regulators of electron transfer in the electron transport chain (ETC) and mitochondrial ATP production, globally evocating mitochondrial dysfunction.

Interestingly, we also found differentiated expression for several proteins involved in calcium signaling. Many proteins such as VDAC1, Atp2b2, Slc6a17, Atp1a2, Cadps involved in Ca^{2+} signaling or in calmodulin binding such as Atp2b2, Basp1, Map2 were differentially expressed, and all of them were consistently up-regulated in HFD brain tissues (Table 2). Noteworthy, Gnai2, Ppp2r1a protein abundances were down-regulated in HFD treated rats.

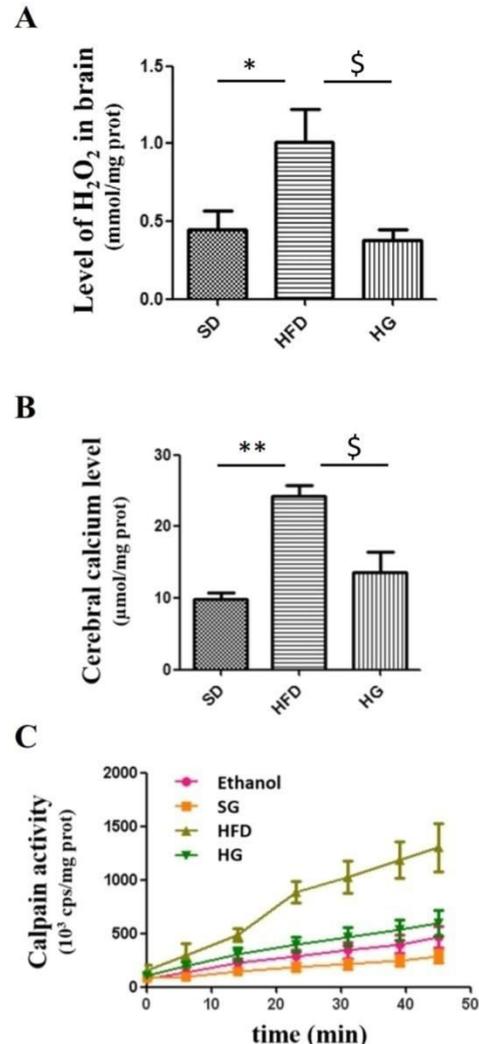


Fig. 4. Protective effect of GSSE on HFD-induced H_2O_2 production (A), calcium level (B) and calpain activity (C). Rats were fed with SD or HFD during 8 weeks and daily treated with GSSE (500 mg/kg BW). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$). Significance between groups was evaluated using Student's *t*-test. For multiple comparisons, one-way analysis of variance (ANOVA) was used and $p < 0.05$ was considered significant (* indicates significance for HFD vs SD and § for HFD vs HG).

Analyzing other functional brain affected pathways, many proteins associated to the cytoskeleton were down-regulated in HFD rat brains namely Fgg, Fga, Actn1 and mbp whereas proteins involved in glycolysis/gluconeogenesis were either up-regulated (Eno1 and Eno2) or down-regulated (Gapdh, Gpd2) in HFD brains. Furthermore, actors of HIF signaling were also regulated when comparing HFD/SD brain tissues. Treating rats with HFD inhibits the cytochrome *c* oxidase (Mtco2) potentially leading to an oxidative stress within brain tissues.

3.2.3. Higher level of H_2O_2 in HFD fed rats

Given the involvement of proteins linked to mitochondrial dysfunction and brain oxidative stress, the H_2O_2 (hydrogen peroxide) level was measured in brain samples (Fig. 4A). HFD treated rats present a 2-fold significant increase ($p = 0.0178$) compared to SD rat brains. This means that treating rats with HFD, establishing excessive fat tissue, had a major impact in producing ROS and enhanced H_2O_2 generation

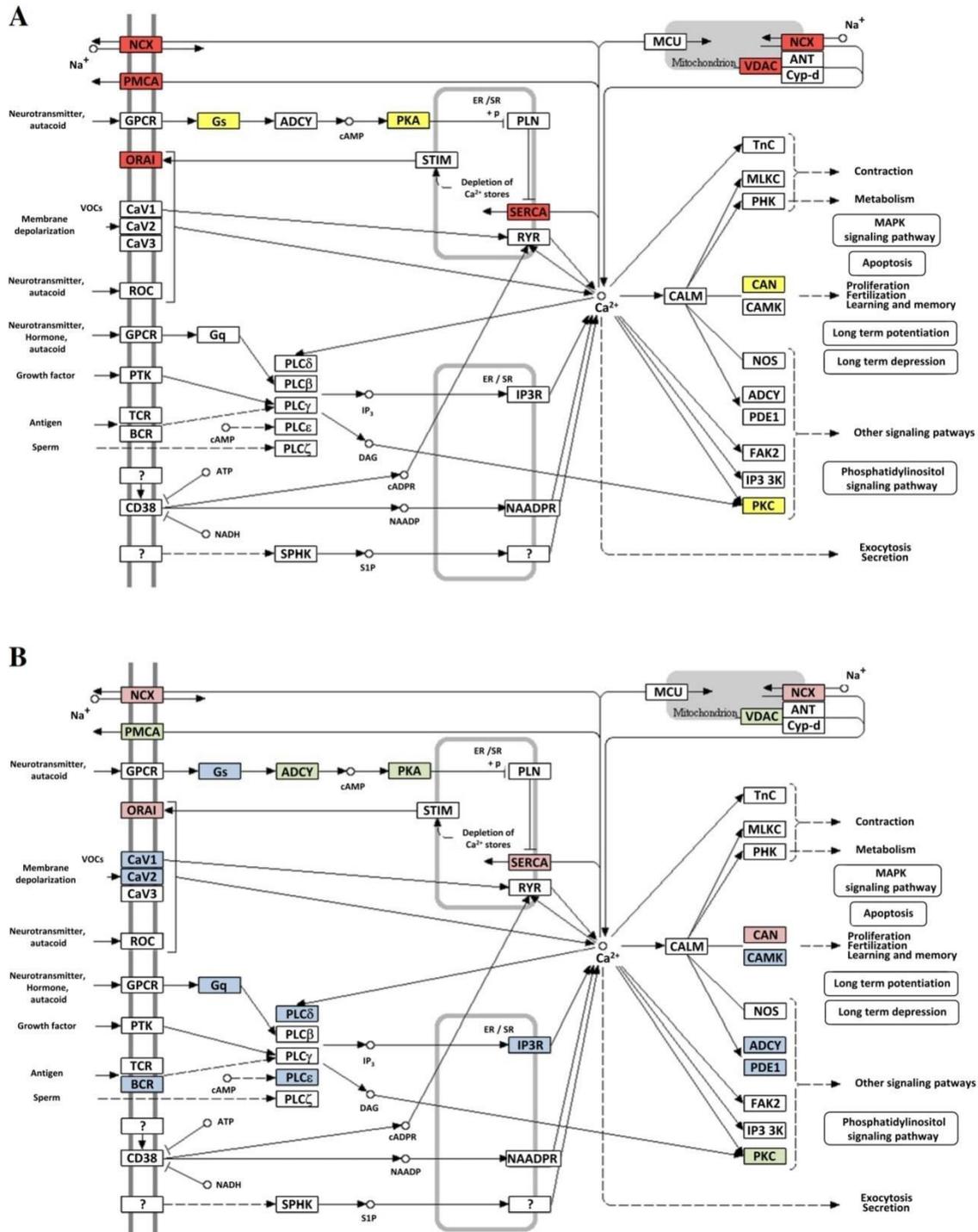


Fig. 5. Abundance modifications of proteins involved in calcium signaling according to the various treatment. (A) Comparison of SD and HFD conditions: proteins presenting higher abundance in HFD are in red and proteins presenting lower level in yellow. (B) Corrections brought by GSSE exposure on HFD treated animals: proteins whose level is corrected by GSSE are in green; proteins in pink are uncorrected by GSSE; proteins in light blue correspond to new proteins appearing in GSSE condition.

in brain samples. Most interestingly, GSSE corrected the increase in H_2O_2 and reverted it to control level.

3.3. Functional analysis and pathways altered in HFD supplemented with GSSE

The exposure to GSSE massively modified the protein pattern of brain tissues. Indeed, the level of 307 proteins were significantly ($p < 0.05$) changed in the brain of HG animals compared to HFD animals (Fig. 3B). Out of these 307 proteins, a further filtering step was applied to retain proteins exhibiting mean fold change > 2 for pathway analysis. The remaining 278 proteins (Supplementary Table 1) were thereafter submitted to dedicated bioinformatic tools to highlight the mainly modified metabolic pathways.

The most significantly down-regulated pathways in HG treated rats covered oxidative phosphorylation, calcium signaling, HIF signaling and glycolysis/gluconeogenesis pathways, processes up-regulated after HFD treatment. Other decreased processes included FOXO signaling pathway, chemokine immunity signaling and platelet activation signal which were not previously shown to be affected after feeding animals with HFD.

Our data show that half of the oxidative phosphorylation proteins altered by HFD treatment was corrected by GSSE. In fact, expression of succinate dehydrogenase (complex II), cytochrome b/c1 complex and cytochrome c oxidase (complex III and IV) were up-regulated upon GSSE treatment. However, treating rats with GSSE modified other proteins that were not affected by HFD such as NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe—S protein 2 which is a core subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (complex I) that catalyzes the NADH oxidation with concomitant ubiquinone reduction and proton ejection out of the mitochondrial matrix (see Supplementary Fig. 2B).

From the present analysis, treating rats with GSSE corrected most of the altered protein abundances involved in calcium signaling. These proteins are implicated in calcium homeostasis mechanisms including Ca^{2+} influx through voltage-operated and receptor-operated channels (ROCs), Ca^{2+} buffering by the plasma membrane and cytosolic proteins, Ca^{2+} storage in intracellular organelles and Ca^{2+} efflux. As stated above, many other proteins not affected by HFD treatment, were induced upon GSSE exposure, such as L-type calcium channels (CaV1 and 2) which play a crucial role in membrane depolarization or the inositol triphosphate receptor (IP3R) located in the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum (ER/SR) involved in the regulation of Ca^{2+} release. The calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CAM kinase) is another example of the significantly differentiated proteins belonging to the calcium signaling pathway that did not appear when comparing HFD/SD rat brains but induced by GSSE treatment (Fig. 5B).

When analyzing the glycolysis/neoglucogenesis pathway, alteration in several key enzymes (up or down regulated) was noticed in the brain of HFD treated animals, including Eno1, Eno2, Gpdk, Gpdh2 and Hspa9. Here again HFD-induced modifications in the glycolysis/neoglucogenesis pathway were also corrected upon GSSE treatment.

3.4. Validation of proteomic data

To further confirm the differential proteomic approach showing the HFD effect and GSSE protection, we specifically explored some key molecular targets by an independent quantitation after immuno-detection using the same samples. The choice of the antibodies has been carried out on 4 proteins among which 3 proteins (Eno1, VDAC1 and Gpdk) were listed in the comparative label free analysis and the fourth protein is the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). Western blot analysis evidenced a significant up-regulation of Eno1, VDAC1, Gpdk and PPAR in HFD treated rats compared with SD (Supplementary Fig. 4), as well as a strong GSSE correction for the three

proteins. In fact, GSSE corrected almost all disturbances of the brain proteins to even a lower level than control, which underlined its protective effect on brain lipotoxicity and further corroborated the proteomic analysis.

3.5. Calcium and calpain activity determination

We further sought to determine if the implication of calcium signaling pathways in brain lipotoxicity could be confirmed by corresponding Ca^{2+} measurement. HFD treatment clearly elevated calcium by 150 % ($p = 0.0021$) whereas GSSE efficiently backed it to near control level (Fig. 4B). We also evaluated the impact of HFD and GSSE treatment on relevant brain enzyme activities. HFD highly increased the activity of the Ca^{2+} dependent protease calpain (Fig. 4C) and GSSE efficiently counteracted it as it restored the protease activity closed to control level.

4. Discussion

Brain dysfunction is nowadays considered as one of the major underlying defects linked to obesity but also for many other metabolic disorders. Focusing on the changes in proteins and pathways can serve as a reference to better understand and ultimately provide therapeutic options for the disease.

With this purpose in mind, a quantitative proteomic approach has been undertaken to identify the protein expression changes in rat brain using an HFD induced obesity model. Our data illustrate that, in the brain, HFD triggers a coordinated alteration in various metabolic pathways including calcium signaling, oxidative phosphorylation, glycolysis/neoglucogenesis and the HIF signaling pathway.

It is worth mentioning that we deliberately used whole brain proteome for at least two main reasons. The first one is linked to the fact that several recent works outlined that obesity-induced neuro-inflammation extend beyond the hypothalamus to affect areas directly related to cognition as frontal and parietal cortex, corpus callosum and hippocampus [20,21]. Secondly, several aspects of the model have been described before and the proteomic approach used in the present study may add substantial piece to the puzzle if conducted in the same experimental condition.

Nevertheless our approach consisting in the use of whole brain proteome may suffer from some limitations. Indeed, neuroproteomics approaches aimed at the profiling of total brain tissue mainly reflect the expression of the most abundant proteins and fail to uncover less abundant proteins. Focusing on sub-proteomes or targeted proteomes after tissue compartmentation would certainly provide more specific insights into brain function and allow to reveal minute differences in protein constitution of related brain areas [22].

During normal cellular respiration, O_2 is reduced to H_2O in mitochondria by oxidative phosphorylation (OXPHOS), which produces energy in the form of ATP for cell function. During these reactions, electrons travel through the mitochondrial electron transfer chain (ETC). The complexes I to IV work to establish a proton gradient across the inner membrane of the mitochondria that creates the electrochemical energy gradient to drive complex V to synthesize ATP. This pathway is significantly down-represented in HFD brains.

We found that the 4 complexes (I, II, III and IV) were coordinately inhibited according to the down regulation of their enzymatic activities, whereas ATPases of the fifth complex of the respiratory chain were up-regulated, fully confirming a previous work [23]. The most striking finding was a fall in the amount of several OXPHOS subunits in HFD-fed mice. In fact, the activity and assembly of most OXPHOS complexes was decreased to about 50–60% particularly the mitochondrial-DNA-encoded subunits. This result is reminiscent of our previous work where accumulation of cholesterol and phospholipids but not triglycerides, was shown to be at the basis of obesity related brain lipotoxicity [12] and which is further supported by a recent work on cholesterol-fed rabbit as a model for Alzheimer disease in which mitochondrial

oxidative phosphorylation proteins were shown to be down regulated [24].

In addition, regulation of Ca^{2+} homeostasis in the brain plays a key role in cellular function and cell to cell communication [25]. We showed in the present study that the calcium signaling pathway was significantly enhanced in HFD rat brains and this result was further supported by higher calcium level into HFD brains when compared to SD. This latter result fits rather well with a previous work on arachidonic acid-induced injury to spinal cord neuron suggesting the toxic effect of HFD by means of intracellular calcium elevation [26].

Among these proteins, VDAC and plasma membrane Ca^{2+} transporting ATPase were present. Recent studies on liver mitochondria from HFD diabetic mice [27] have shown an increased abundance of the contact site-specific protein VDAC that can affect the condensed appearance of the liver mitochondria by increased crista junctions. VDAC1 protein performs several key functions in the brain, including maintaining synaptic plasticity, mitochondrial permeability transition pore, regulating the shape and structure of mitochondria, and also linking glycolytic enzymes interaction with mitochondria and apoptosis signaling [28]. Our present data revealed that VDAC1 is overexpressed under HFD treatment as it was the case in the hippocampus from AD transgenic mice models [29].

The brain is believed to be the most vulnerable organ to oxidative stress, as it contains high level of poly-unsaturated fatty acids (PUFA) susceptible to lipid peroxidation, consumes large amounts of oxygen for energy production by the OXPHOS pathway, and has low antioxidant defenses compared to other organs [30]. Our proteomic analysis also highlighted the involvement of many proteins from sugar metabolism, namely Eno1, Eno2 and Hspa9 which are consistently accumulated upon HFD whereas two other proteins namely Gapdh and Gpd2 are underexpressed.

The most relevant finding drawn from our study is the protection afforded by GSSE against the deleterious effect of HFD. As GSSE was administered during 8 weeks, its protection really reflects a preventive effect against HFD-induced oxidative stress. To our knowledge our report is the first molecular study to show that GSSE is protective against brain lipotoxicity as it down regulated some key proteins implicated in calcium signaling and oxidative phosphorylation that were altered by HFD. Noticeably, GSSE was recently shown to be protective against chemotherapy [31], garlic [32] and ischemia-induced brain injury [33] owing to its antioxidant [12] and anti-apoptotic properties [34].

Interestingly, calcium channel blockade by nifedipine was shown to reduce network activity in human epilepsy [35] which suggested a potential therapeutic option of L-type calcium channel blockers in epileptic patients. Calcium fluxes are mediated by several types of calcium channels which are found in excitable tissues as heart, pancreas and brain [36]. GSSE counteracted the effect of HFD on calcium current abundance or activity and its mode of action should be further investigated using calcium channel blockers as nifedipine or verapamil. From our proteomic analysis we can conclude that even though GSSE counteracted the calcium signaling pathway induced by HFD, only VDAC and plasma membrane Ca^{2+} transporting ATPase (PMCA) seem to be important actors of these regulations. In addition, our data fully agree with a recent work in the field, demonstrating that HFD treatment provoked a burst in Ca^{2+} and that GSSE backed it to SD level [12]. Besides, a recent work demonstrated that a proanthocyanidin extract inhibited glutamate-induced cell death through down regulation of calcium and NO signaling in rat hippocampal neurons [37]. It is tempting to speculate on the use of GSSE either alone or as an adjuvant to calcium current blockers as verapamil or nifedipine in the prevention of brain disorders characterized by calcium dyshomeostasis.

The burst in Ca^{2+} also triggers various apoptotic pathways such as those involving the activation of calpain, a family of calcium-dependent cysteine proteases that cleave relevant target proteins conferring to calpain a tremendous role in neurodegenerative disorders [38]. This

result was supported by the demonstration of HFD-induced increase in calpain activity and by the prophylactic effect of GSSE.

In addition, concordant findings were described in the literature regarding to HIF signaling and FTO expression [39–41]. It is generally admitted that HIF pathway is overexpressed in many type of cancers through increased expression of HIF1b and HIF2b which regulates mitochondrial activity by increasing the transcription of the electron transport chain subunit IV-2 [42]. Several studies have reported the strong influence of HIF signaling pathway on lipid and glycogen metabolism. HIF can enhance glycogen synthesis under hypoxia in various cells by inducing the first enzyme in neoglucogenesis and can also induce the phosphatidate phosphatase isoform lipin 1, which is an enzyme involved in triglyceride biosynthesis [43]. As both glucose and lipid metabolism were altered by HFD and corrected upon GSSE treatment, the polyphenol extract could be a potential preventive agent against the deleterious and insidious effect of HFD over decades on brain homeostasis. Based on this, we propose that the increased expression of proteins belonging to HIF signaling pathway in HFD brains can be one of the defensive mechanisms to protect from ROS mediated oxidative stress. GSSE afforded a protective effect by restoring the expression of several proteins that were either up regulated (Eno1, Eno2, VDAC, calcium signaling like Atp2b2 or Cadps, exemplified in Supplementary Fig. 4) or down regulated (SNAP-25, Gapdh, Gpd2, Mtco2, PP2RA1, MBP-1). Thus for instance, inhibition of the glycolytic enzyme Gapdh enhances the neural vulnerability to excitotoxicity both in vivo and in vitro through an unknown mechanism possibly related to mitochondrial failure and also enhances β amyloid vulnerability of the hippocampus [44]. Moreover Gapdh has recently been shown to be a GABA_A receptor kinase that links glycolysis to neurotransmission [45]. Several reports highlighted the involvement of Gapdh in neurodegeneration by means of non-glycolytic activity in brain of AD patients [46,47]. In addition Gapdh exhibits non catalytic role by means of Gapdh oligomerization-induced cell death [48] and via its association with VDAC1, Gapdh is also able to induce pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization [49].

As another key protein, SNAP-25 which is part of the SNARE complex involved in synaptic vesicle membrane docking and fusion, is down regulated upon HFD treatment as it was demonstrated to be the case in AD brains [50] or vascular dementia [51]. Once again GSSE counteracted the HFD-induced fall in abundance of this key synaptic protein.

MBP-1, another relevant protein involved in brain myelination is down regulated upon HFD exposure, suggesting long term and long lasting deleterious effect of fat on brain function, which is prevented by high dosage GSSE. This result is to be compared to the recently promoting remyelination effect of high dosage resveratrol (250 mg/kg) in cuprizone model of multiple sclerosis [52].

Another notable result is the increased expression of VDAC1 upon HFD exposure and its prevention by GSSE. Interestingly, VDAC1 which is overexpressed in brain of AD patients, is involved in amyloid β -mediated toxicity leading to mitochondrial dysfunction and apoptosis, and as such, constitutes an early sensor of lipid toxicity [53] and a potential target for therapeutics as mitochondriotropic plant polyphenols like resveratrol [54].

High resolution quantitative proteomics supported by western blot analysis, revealed that GSSE efficiently prevented from various brain pathways disturbances triggered by HFD i-e calcium signaling, glycolysis, ion channels dysfunction, oxidative phosphorylation leading to lipotoxicity-induced apoptosis and brain dysfunction. The protective effect of GSSE has also been monitored through the down-regulation of specific targets such as VDAC, ENO1, GAPDH and also PPAR γ , a transcription factor that plays a key role in adipogenesis and lipogenesis [55], whose expression increased in adipose tissue of HFD fed mice [56] and an agonist of which has been used to treat obese mice [57,58].

In summary, by using quantitative proteomic analysis, biochemical and bio-informatic tools, we identified actors of metabolic and

biological pathways that were dysregulated in brain of experimentally-induced obese rats and corrected by GSSE treatment. While our data are consistent with previous findings of obesity-induced brain lipotoxicity, such as enhancement of proteins belonging to the OXPHOS and calcium pathways, they also unveiled novel pathways including the up-regulation of HIF signaling pathway in HFD brains. In the same context, GSSE abrogated HFD-induced signaling pathway elevation either by modulating several proteins or by inducing some others that were not affected by HFD. Future studies are warranted to address the specific role of these proteins in the pathogenesis of fat-induced brain lipotoxicity and how GSSE affected them to be used as a therapeutic extract.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.03.001>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

References

- [1] M. Ng, T. Fleming, M. Robinson, B. Thomson, N. Graetz, C. Margono, et al., Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013, *Lancet* 384 (2014) 766–781.
- [2] C.C. Imes, L.E. Burke, The obesity epidemic: the United States as a cautionary tale for the rest of the world, *Curr. Epidemiol. Rep.* 1 (2014) 82–88.
- [3] T. Lobstein, R. Jackson-Leach, M.L. Moodie, K.D. Hall, S.L. Gortmaker, B.A. Swinburn, et al., Child and adolescent obesity: part of a bigger picture, *Lancet* 385 (2015) 2510–2520.
- [4] I. Vucenik, J.P. Stains, Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1271 (2012) 37–43.
- [5] L. Landsberg, L.J. Aronne, L.J. Beilin, V. Burke, L.I. Igel, D. Lloyd-Jones, et al., Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment, *J. Clin. Hypertens.* 15 (2013) 14–33.
- [6] Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration (BMI Mediated Effects) Y. Lu, K. Hajifathalian, M. Ezzati, M. Woodward, E.B. Rimm, et al., Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1.8 million participants, *Lancet Lond. Engl.* 383 (2014) 970–983.
- [7] C.G. Bell, A.J. Walley, P. Froguel, The genetics of human obesity, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 221–234.
- [8] K. Giskes, F. van Lenthe, M. Avendano-Pabon, J. Brug, A systematic review of environmental factors and obesogenic dietary intakes among adults: are we getting closer to understanding obesogenic environments? *Obes. Rev.* 12 (2011) e95–e106.
- [9] S. Barceló-Batllo, R. Gomis, Proteomics in obesity research, *Proteomics Clin. Appl.* 3 (2009) 263–278.
- [10] I. Baiges, J. Palmfeldt, C. Bladé, N. Gregersen, L. Arola, Lipogenesis is decreased by grape seed proanthocyanidins according to liver proteomics of rats fed a high fat diet, *Mol. Cell. Proteomics* 9 (2010) 1499–1513.
- [11] K. Charradi, H. Sebai, S. Elkahoui, F. Ben Hassine, F. Limam, E. Aouani, Grape seed extract alleviates high-fat diet-induced obesity and heart dysfunction by preventing cardiac siderosis, *Cardiovasc. Toxicol.* 11 (2011) 28–37.
- [12] K. Charradi, S. Elkahoui, I. Karkouch, F. Limam, F.B. Hassine, E. Aouani, Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat, *Neurochem. Res.* 37 (2012) 2004–2013.
- [13] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [14] M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [15] D. Szklarczyk, A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, et al., STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) D447–D452.
- [16] K. Kakinuma, T. Yamaguchi, M. Kaneda, et al., Determination of H₂O₂ release by the treatment of human blood polymorphonuclear leucocytes with myristate, *J. Biochem.* 86 (1979) 87–95.
- [17] J. Stern, W.H. Lewis, The colorimetric estimation of calcium in serum with ocreolophthalein complexone, *Clin. Chim. Acta* 2 (1957) 576–580.
- [18] T. Sasaki, T. Kikuchi, N. Yumoto, N. Yoshimura, T. Murachi, Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 12489–12494.
- [19] B. Zhang, N.C. VerBerkmoes, M.A. Langston, E. Uberbacher, R.L. Hettich, N.F. Samatova, Detecting differential and correlated protein expression in label-free shotgun proteomics, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 2909–2918.
- [20] M. Sherman, M.M. Liu, S. Birnbaum, S.E. Wolf, J.P. Minei, J.W. Gatson, Adult obese mice suffer from chronic secondary brain injury after mild TBI, *J. Neuroinflammation* 13 (2016) 171–181.
- [21] J.C.D. Nguyen, A.S. Kilcross, T.A. Jenkins, Obesity and cognitive decline: role of inflammation and vascular changes, *Front. Neurosci.* 8 (2014), 375.
- [22] F. Tribl, H.E. Meyer, K. Marcus, Analysis of organelles within the nervous system: impact on brain and organelles functions, *Expert Rev. Proteomics* 5 (2008) 333–351.
- [23] I. García-Ruiz, P. Solís-Muñoz, D. Fernández-Moreira, M. Grau, F. Colina, T. Muñoz-Yagüe, et al., High-fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation complexes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice, *Dis. Model. Mech.* 7 (2014) 1287–1296.
- [24] Q.Y. Liu, R. Koukietoko, D.L. Zhang, B. Smith, D. Ly, J.X. Lei, et al., Molecular events linking cholesterol to Alzheimer's disease and inclusion body myositis in a rabbit model, *Am. J. Neurodegener. Dis.* 5 (2016) 74–84.
- [25] H. Hartmann, A. Eckert, W.E. Müller, Disturbances of the neuronal calcium homeostasis in the aging nervous system, *Life Sci.* 55 (1994) 2011–2018.
- [26] M. Toborek, A. Malecki, R. Garrido, M.P. Mattson, B. Hennig, B. Young, Arachidonic acid-induced oxidative injury to cultured spinal cord neurons, *J. Neurochem.* 73 (1999) 684–692.
- [27] Y. Guo, M. Darshi, Y. Ma, G.A. Perkins, Z. Shen, K.J. Haushalter, et al., Quantitative proteomic and functional analysis of liver mitochondria from high fat diet (HFD) diabetic mice, *Mol. Cell. Proteomics* 12 (2013) 3744–3758.
- [28] A. Raghavan, T. Sheiko, B.H. Graham, W.J. Craigie, Voltage-dependant anion channels: novel insight into isoform function through genetic model, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1477–1485.
- [29] M. Guadrado-Tejedor, M. Vilarino, F. Cabodevilla, J. Del Rio, D. Frechilla, A. Perez-Mediavilla, Enhanced expression of the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) in Alzheimer's disease transgenic mice: an insight into the pathogenic effects of amyloid- β , *J. Alzheimers Dis.* 23 (2011) 195–206.
- [30] R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher, Altered lipid metabolism in brain injury and disorders, *Subcell. Biochem.* 49 (2008) 241–268.
- [31] M. Mokni, S. Hamlaoui-Guesmi, M. Amri, L. Marzouki, F. Limam, E. Aouani, Grape seed and skin extract protects against acute chemotherapy toxicity induced by doxorubicin in rat heart, *Cardiovasc. Toxicol.* 12 (2012) 158–165.
- [32] S. Hamlaoui-Guesmi, M. Mokni, N. Limam, P. N'guessan, A. Carrier, F. Limam, et al., Grape seed and skin extract mitigates garlic-induced oxidative stress in rat liver, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90 (2012) 547–556.
- [33] K. Safwen, S. Selima, E. Mohamed, L. Ferid, C. Pascal, A. Mohamed, et al., Protective effect of grape seed and skin extract on cerebral ischemia in rat: implication of transition metals, *Int. J. Stroke* 10 (2015) 415–424.
- [34] D. Bagchi, C.K. Sen, S.D. Ray, D.K. Das, M. Bagchi, H.G. Preuss, et al., Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract, *Mutat. Res.* 523–524 (2003) 87–97.
- [35] K.A. Simeone, S. Sabesan, D.Y. Kim, J.F. Kerrigan, J.M. Rho, T.A. Simeone, L-type calcium channel blockade reduces network activity in human epileptic hypothalamic hamartoma tissue, *Epilepsia* 52 (2011) 531–540.
- [36] W.A. Catterall, Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000) 521–555.
- [37] S.-H. Ahn, H.J. Kim, I. Jeong, Y.J. Hong, M.-J. Kim, D.-J. Rhie, et al., Grape seed proanthocyanidin extract inhibits glutamate-induced cell death through inhibition of calcium signals and nitric oxide formation in cultured rat hippocampal neurons, *BMC Neurosci.* 12 (2011) 78.
- [38] S.R. Richmond, M.J. Carper, X. Lei, S. Zhang, K.E. Yarasheski, S. Ramanadham, HIV-protease inhibitors suppress skeletal muscle fatty acid oxidation by reducing CD36 and CPT1 fatty acid transporters, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) 559–566.
- [39] G. Jia, C.-G. Yang, S. Yang, X. Jian, C. Yi, Z. Zhou, et al., Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO, *FEBS Lett.* 582 (2008) 3313–3319.
- [40] G. Jia, Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, et al., N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO, *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 885–887.
- [41] T. Berulava, M. Ziehe, L. Klein-Hitpass, E. Mladenov, J. Thomale, U. Rütger, et al., FTO levels affect RNA modification and the transcriptome, *Eur. J. Hum. Genet.* 21 (2013) 317–323.
- [42] M. Yang, H. Su, T. Soga, K.R. Kranc, P.J. Pollard, Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism, *Hypoxia* 2 (2014) 127–142.
- [43] I. Mylonis, H. Sembongi, C. Befani, P. Liakos, S. Sinioussoglou, G. Simos, Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 3485–3493.
- [44] D. Cano-Ramírez, C.E. Torres-Vargas, S. Guerrero-Castillo, S. Uribe-Carvajal, R. Hernández-Pando, J. Pedraza-Chaverri, et al., Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 26 (2012) 206–211.
- [45] J.J. Laschet, F. Minier, I. Kurcewicz, M.H. Bureau, S. Trottier, F. Jeanneteau, et al., Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABA_A receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition, *J. Neurosci.* 24 (2004) 7614–7622.
- [46] N. El Kadmiri, R. Cuadros, B. El Moutawakil, I. Slassi, J. Avila, S. Nadifi, et al., A proteomic approach for the involvement of the GAPDH in Alzheimer disease in the blood of Moroccan FAD cases, *J. Mol. Neurobiol.* 54 (2014) 774–779.
- [47] C.L. Ávila, C.M. Torres-Bugeau, L.R. Barbosa, E.M. Sales, M.O. Ouidja, S.B. Socias, et al., Structural characterization of heparin-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protofibrils preventing α -synuclein oligomeric species toxicity, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 13838–13850.
- [48] N. Qvit, A.U. Joshi, A.D. Cunningham, J.C.B. Ferreira, D. Mochly-Rosen, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) protein-protein interaction inhibitor reveals a non-catalytic role for GAPDH oligomerization in cell death, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 13608–13621.

- [49] A. Tarze, A. Deniaud, M. Le Bras, E. Maillier, D. Molle, N. Larochette, et al., GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization, *Oncogene* 26 (2007) 2606–2620.
- [50] S. Greber, G. Lubec, N. Cairns, M. Fountoulakis, Decreased levels of synaptosomal associated protein 25 in the brain of patients with down syndrome and Alzheimer's disease, *Electrophoresis* 20 (1999) 928–934.
- [51] L.I. Sinclair, H.M. Tayler, S. Love, Synaptic protein levels altered in vascular dementia, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41 (2015) 533–543.
- [52] H.R. Ghaiad, M.M. Nooh, M.M. El-Sawalhi, A.A. Saheen, Resveratrol promotes remyelination in cuprizone model of multiple sclerosis: biochemical and histological study, *Mol. Neurobiol.* 53 (Apr 11 2016) 1403–2081.
- [53] C. Martel, M. Allouche, D.D. Esposti, E. Fanelli, C. Boursier, C. Henry, et al., Glycogen synthase kinase 3-mediated voltage-dependent anion channel phosphorylation controls outer mitochondrial membrane permeability during lipid accumulation, *Hepatology* 57 (2013) 93–102.
- [54] Z. Liao, D. Liu, L. Tang, D. Yin, S. Yin, S. Lai, et al., Long-term oral resveratrol intake provides nutritional preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury: involvement of VDAC1 downregulation, *Mol. Nutr. Food Res.* 59 (2015) 454–464.
- [55] V.S. Mattevi, V.M. Zembruski, M.H. Hutz, Effects of a PPAR γ gene variant on obesity characteristics in Brazil, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40 (2007) 927–932.
- [56] J.-C. Sanchez, V. Converset, A. Nolan, G. Schmid, S. Wang, M. Heller, et al., Effect of rosiglitazone on the differential expression of obesity and insulin resistance associated proteins in lep/lep mice, *Proteomics* 3 (2003) 1500–1520.
- [57] H.E. Bays, Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets, *Obes. Res.* 12 (2004) 1197–1211.
- [58] A. Vidal-Puig, M. Jimenez-Liñan, B.B. Lowell, A. Hamann, E. Hu, B. Spiegelman, et al., Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 2553–2561.