

TITRE DU PROJET : Métabolisme des plasmalogènes et inflammation au cours de l'athérosclérose

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : MASSON

Prénom : David

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- Nom de la structure de recherche : UMR1231-CTM-Equipe Lipness
- Localisation : UFR des sciences de santé-Boulevard Jeanne d'Arc-21000 Dijon
- Directeur de thèse : David MASSON
- Contact : David.masson@u-bourgogne.fr

Description du projet :

1. Contexte scientifique et objectifs du projet

Au cours des dernières années, le développement des approches lipidomiques à grande échelle a permis d'identifier des signatures lipidiques complexes associées au risque cardiovasculaire chez des patients présentant des atteintes métaboliques. De manière intéressante, plusieurs études indépendantes ont mis en évidence que les concentrations de certains membres d'une classe spécifique de phospholipides, les plasmalogènes, étaient altérées chez des patients présentant des atteintes métaboliques et étaient associées au risque cardiovasculaire et à la présence de plaques instables chez des patients coronariens^{1,2} Les plasmalogènes ont la particularité de présenter un alcool gras en position sn-1 du glycérol relié par une liaison vinyl-ether alors qu'un acide gras relié par une liaison acyl est classiquement présent dans les autres catégories de phospholipides. La liaison vinyl-ether confère des propriétés spécifiques aux plasmalogènes, ainsi ils peuvent moduler les propriétés des membranes cellulaires (fluidité, formation de microdomaines) et les processus biologiques associés. Ils joueraient également un rôle dans la protection contre les processus oxydatifs, en effet la liaison vinyl-ether est très sensible aux attaques par les espèces réactives de l'oxygène et pourrait donc protéger les autres biomolécules des dommages oxydatifs. Du fait de la présence abondante d'acides gras polyinsaturés en position sn-2, les plasmalogènes constituent un réservoir pour la formation de médiateurs oxygénés dérivés des acides gras via la voie des lipo- et cyclo-oxygénases. Enfin des données plus récentes suggèrent un rôle important des plasmalogènes dans la régulation des processus de mort cellulaire notamment la ferroptose.⁴ La biosynthèse des plasmalogènes est un processus métabolique complexe. De manière intéressante, les enzymes impliquées dans les dernières étapes de la voie de biosynthèse n'ont été identifiées que très récemment, comme TMEM189 responsable de la formation de la liaison vinyle caractéristique des plasmalogènes.⁵ Les altérations des niveaux circulants de plasmalogènes dans les maladies cardiométaboliques, et l'association de certaines espèces de plasmalogènes avec le risque cardiovasculaire suggèrent un lien entre le métabolisme des plasmalogènes et athérosclérose.

Bien qu'un effet systémique des plasmalogènes ne puisse être écarté, notre hypothèse est que des altérations du métabolisme des plasmalogènes dans les cellules immunitaires et *in situ* au niveau de la plaque d'athérome pourraient contribuer au processus athéromateux. En faveur de cette hypothèse, les concentrations de plasmalogènes dans les plaques carotidiennes humaines sont modifiées en fonction du degré d'évolution de la plaque.⁶ De plus les plasmalogènes sont très abondants dans les macrophages et leur métabolisme est modulé par les LDL oxydées présentes au niveau de la plaque.⁷ Différents travaux ont démontré que les plasmalogènes pouvaient moduler des fonctions clés des macrophages comme la réponse inflammatoire (comme source d'eicosanoïdes)⁸ ou bien la capacité de phagocytose des macrophages (via la modulation de la fluidité membranaire et la formation de microdomaines).⁹ A ce jour, des preuves directes de l'implication du métabolisme des plasmalogènes au niveau des macrophages sur le processus athéromateux restent à apporter. Ce projet de recherche ciblera donc spécifiquement le métabolisme des plasmalogènes au sein des cellules myéloïdes et cherchera à évaluer l'impact de cette modulation sur les mécanismes de mort des macrophages et sur le développement de l'athérosclérose dans un modèle murin. Il comportera également un volet translationnel avec une cohorte de patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde.

2. Méthodologie employée

Nous mettrons à profit la disponibilité de souris présentant une inactivation de *Tmem189* (*PEDS1*). Ces souris seront utilisées pour générer des macrophages dérivés de moelle osseuse *in vitro* et pour des études de transplantation de cellules hématopoïétiques

2.1. Impact du remodelage des plasmalogènes sur la mort des macrophages induite par les oxystérols et les LDL oxydées.

Il s'agira d'étudier comment un déficit de biosynthèse des plasmalogènes module la susceptibilité des macrophages à l'apoptose ou la ferroptose et de comprendre les mécanismes potentiellement impliqués. Des macrophages primaires dérivés de moelle osseuse de souris WT et *Tmem189^{KO}* seront obtenus par différenciation en présence de M-CSF. Une caractérisation du phénotype des macrophages sera réalisée (réponse inflammatoire, capacité d'efferocytose) ; Une analyse lipidomique ciblée des macrophages sera notamment effectuée (phospholipides, plasmalogènes, acides gras) afin de valider le déficit de la voie de biosynthèse des plasmalogènes. Les macrophages seront incubés en présence de LDL oxydées et de 7-kétocholestérol pour induire l'apoptose. La susceptibilité à la ferroptose sera évaluée en traitant les macrophages par des inhibiteurs de glutathion peroxydase (RSL3). La mort cellulaire sera évaluée par des techniques classiques (annexine V/ IP ; Mesure de la condensation nucléaire, mesure de l'activité LDH). La structure membranaire (microdomaines, fluidité) sera explorée par des approches de cytométrie en flux ou par microscopie (marquage perfringolysine-GFP). Les microdomaines lipidiques seront isolés et analysés. En parallèle, les marqueurs de stress oxydant et d'oxydation des lipides seront évalués (mesure des ROS, dosage du 4-HNE), la mesure spécifique des phospholipides oxydés (marqueurs de ferroptose) et des produits de dégradation des plasmalogènes sera effectuée en collaboration avec la plate-forme de lipidomique de l'université de Bourgogne.

2.2 Impact du remodelage des plasmalogènes sur le développement de l'athérosclérose

Objectifs: Compte tenu du rôle critique des macrophages et des cellules myéloïdes dans le processus athéromateux, nous souhaitons évaluer les conséquences d'un déficit en de cette voie sur le développement de l'athérosclérose dans un modèle murin en utilisant les souris *Tmem189^{-/-}*. Une stratégie de transplantation de cellules hématopoïétiques sera mise en place en utilisant des souris type sauvage et *Tmem189^{-/-}* comme donneurs et des souris *Ldlr^{-/-}* comme receveuses. Les souris seront soumises à un régime riche en cholestérol pendant 12 semaines avant sacrifice. N=15 *Ldlr^{-/-}* femelles seront utilisées dans chaque groupe. Le profil

lipoprotéique et les paramètres hématologiques analysés à 4, 8 et 12 semaines. Une caractérisation complète des lésions sera effectuée incluant la surface de plaque et des cœurs nécrotiques, l'infiltration des macrophages, le contenu en collagène et la mesure des cellules apoptotiques.

Financement du projet – partie Recherche : Financement annuels récurrents équipe Lipness, financement ANR PRC collaboratif Thelma (2024-26), Financement fondation de France (2024-2025)

Connaissances et compétences requises :

Connaissances niveau master en Biochimie, Biologie moléculaire, notamment en biochimie métabolique (voies du métabolisme lipidique) et biochimie structurale (structure et composition des molécules lipidiques)

Connaissances niveau master en biologie cellulaire (voies de signalisation cellulaires impliquées dans l'inflammation et la mort cellulaire)

Connaissances niveau master en physiologie et physiopathologie (système cardiovasculaire, immunité innée, maladies cardiovasculaires, modèle expérimentaux)

Compétences : maîtrise des techniques de biologie moléculaires et cellulaire (extraction et analyse d'acide nucléiques, des protéines, des molécules lipidiques par approches ciblées et globales). Maîtrise des techniques de culture cellulaire (culture, transfection clonage). Notions concernant l'expérimentation animales et l'analyse biostatistique requises.

Résumé en français et anglais

Les concentrations d'une classe spécifique de phospholipides, les plasmalogènes, sont altérées chez des patients présentant des atteintes métaboliques (diabète de type 2) et sont associées au risque cardiovasculaire. Les plasmalogènes ont une structure originale qui leur confère des propriétés spécifiques : ils modulent fluidité des membranes cellulaires et ils protègent contre les processus oxydatifs. Notre hypothèse est que des altérations du métabolisme des plasmalogènes in situ au niveau de la plaque d'athérome pourraient contribuer au processus athéromateux. Notre équipe a en effet démontré que des enzymes contrôlant la composition en acides gras des plasmalogènes au sein des macrophages modulait le développement de l'athérosclérose et la formation de cœur nécrotique au sein de la plaque. Objectif/Méthodologie : Ce projet de recherche ciblera spécifiquement le métabolisme des plasmalogènes au sein des cellules myéloïdes. Nous mettrons à profit la disponibilité de souris présentant une inactivation spécifique de la voie de synthèse des plasmalogènes. Ce modèle sera utilisé pour des approches in vitro : production de macrophages et caractérisation de leur phénotype. Nous évaluerons également le développement de l'athérosclérose dans un modèle de souris *Ldlr^{-/-}* après transplantation de cellules hématopoïétiques de souris déficientes pour la synthèse des plasmalogènes. Ce projet comportera enfin un volet translationnel et permettra l'évaluer l'association entre concentrations plasmatiques en plasmalogènes et réponse inflammatoire chez des patients en phase aigüe d'infarctus du myocarde. Perspectives : Ce projet pourrait mettre en évidence des mécanismes originaux associant plasmalogènes et activation des cellules myéloïdes. Ce projet permettra de valider les plasmalogènes comme biomarqueurs dans le cadre de l'inflammation associée au syndrome coronarien aigu en vue d'une meilleure stratification des risques.

The concentrations of a specific class of phospholipids, plasmalogens, are altered in patients with metabolic disorders (type 2 diabetes) and are associated with cardiovascular risk. Plasmalogens have a unique structure that gives them specific properties: they modulate the fluidity of cell membranes and protect against oxidative processes. Our hypothesis is that

alterations in the metabolism of plasmalogens in situ at the level of the atheroma plaque could contribute to the atheromatous process. Our team has indeed demonstrated that enzymes controlling the fatty acid composition of plasmalogens within macrophages modulated the development of atherosclerosis and the formation of a necrotic core within the plaque. Objective/Methodology: This research project will specifically target the metabolism of plasmalogens within myeloid cells. We will take advantage of the availability of mice with a specific inactivation of the plasmalogen synthesis pathway. This model will be used for in vitro approaches: production of macrophages and characterization of their phenotype. We will also evaluate the development of atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mouse model after transplantation of hematopoietic cells from mice deficient in plasmalogen synthesis. Finally, this project will include a translational component and will allow the evaluation of the association between plasma plasmalogen concentrations and inflammatory response in patients in the acute phase of myocardial infarction. Perspectives: This project could highlight original mechanisms associating plasmalogens and activation of myeloid cells. This project will allow the validation of plasmalogens as biomarkers in the context of inflammation associated with acute coronary syndrome for better risk stratification.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

Biochimie

Santé, médecine humaine, vétérinaire

Mots clés : Macrophages, phospholipides, inflammation, Athérosclérose