

## Thèse de Doctorat

Mikaël CROYAL

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Nantes Angers Le Mans*

**École doctorale :** Biologie-Santé

**Discipline :** Recherche clinique, innovation technologique, santé publique

**Spécialité :** Sciences de l'ingénieur

**Unité de recherche :** INRA, UMR1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles  
Institut de Recherche en Santé (IRS), 8 quai Moncoussu, 44000 Nantes

**Soutenu le** 9 juin 2017

# Apports des évolutions de la spectrométrie de masse pour l'étude statique et dynamique du métabolisme des lipides et des lipoprotéines

## JURY

Président du jury	<b>Mr Jean-Marie Bard</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Rapporteurs :	<b>Mr René Valéro</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Marseille <b>Mr Daniel Tomé</b> , Professeur, AgroParisTech, Paris
Examineurs :	<b>Mr Jean-Marie Bard</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes <b>Mr Franck Boccara</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Paris <b>Mr Bruno Le Bizec</b> , Professeur, Université de Nantes <b>Mr Philippe Robert</b> , Pharmacien-Chercheur, Bioprojet-Biotech, Rennes
Directeur de Thèse :	<b>Mr Michel Krempf</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>Mme Estelle Nobécourt-Dupuy</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de La Réunion



# **RÉSUMÉS / ABSTRACTS**

## **Apports des évolutions de la spectrométrie de masse pour l'étude statique et dynamique du métabolisme des lipides et des lipoprotéines**

Les lipides s'associent aux apolipoprotéines pour former les lipoprotéines, nécessaires à leur transport au sein de l'organisme. Nombre de leurs perturbations métaboliques exposent à un risque élevé de maladies cardiovasculaires, et l'évolution de la spectrométrie de masse contribue au développement d'outils diagnostiques précoces de ces dérèglements. La découverte de marqueurs prédictifs des pathologies requiert néanmoins la compréhension fine des mécanismes physiologiques sous-jacents. L'analyse des flux métaboliques par l'utilisation de traceurs isotopiques permet l'accès à ces informations. Ces études demeurent cependant complexes et nécessitent le recours à plusieurs techniques d'analyses longues et coûteuses. L'objectif de ce travail a été de développer des approches originales basées sur la spectrométrie de masse afin d'élargir le champ de ces analyses, statiques comme dynamiques, au métabolisme lipidique. En combinant la protéolyse enzymatique et l'analyse ciblée de peptides signatures, nous avons considérablement simplifié et étendu l'étude des apolipoprotéines jusqu'à accéder simultanément à de nombreuses informations physiologiques telles que leurs concentrations, leurs taux de renouvellement et leurs éventuelles modifications polymorphiques. D'autres outils complémentaires, permettant l'étude ciblée ou non des lipides ainsi que la mesure de leurs enrichissements, ont également été développés afin d'accéder de façon efficace et sensible à leur caractérisation. Les limites de ces méthodes ont été explorées avant d'être appliquées à des études de cas concrets, portant sur des dyslipidémies ou l'efficacité de traitements hypolipémiants.

**Mots clés :** spectrométrie de masse, lipoprotéines, apolipoprotéines, lipides, isotopes stables.

## **Recent advances in mass spectrometry-based methodologies for static and kinetic study of lipid and lipoprotein metabolism**

Lipids bind to apolipoproteins to form lipoproteins, having in charge their transport into the circulation. Numerous metabolic disturbances of lipids expose to an increased risk of cardiovascular diseases. The last advances in mass spectrometry have recently helped to develop usefull tools for early diagnosis of these disorders. Nevertheless, the accurate characterization of predictive markers requires to decipher the physiological mechanisms involved in threir metabolism. Metabolic flux analyses with stable isotope labeled tracers can give such information. However, these studies remain complex, time-consuming and require the use of several technical processes. Therefore, we aimed to develop original mass spectrometry-based approaches to improve this kind of analyses. We have used enzymatic proteolysis and targeted analysis of specific peptides for the study of a large range of apolipoproteins. We were able to get simultaneaously several physiological information such as their concentrations, kinetics and putative polymorphisms. Additional reliable tools, including both targeted and non-targeted lipid analyses as well as their enrichment measurements, have also been developed to improve our level of knowledge. The limitations of these methods were explored before to be applied to specific case studies, such as dyslipidemias (diabetes, hypertriglyceridemia, obesity) or efficacy of lipid-lowering treatments.

**Keywords:** lipoproteins, apolipoproteins, lipids, stable isotopes, mass spectrometry



# **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers le Professeur Michel KREMPF qui a su me témoigner sa confiance en m'offrant cette formidable opportunité de préparer une thèse de doctorat, tout en me confiant la charge du plateau de Spectrométrie de Masse. Je lui en serai éternellement reconnaissant. Un immense merci également au Professeur Estelle NOBECOURT-DUPUY pour son encadrement de qualité, ses précieux conseils et son optimisme.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail, et ce, malgré leur charge de travail. Ainsi, je remercie le Professeur Jean-Marie BARD, président du jury, les Professeurs René VALERO et Daniel TOMÉ, rapporteurs de cette thèse, le Docteur Philippe ROBERT et les Professeurs Bruno LE BIZEC et Franck BOCCARA, examinateurs. Je vous exprime ici ma très sincère reconnaissance.

Je remercie également le Professeur Gilles LAMBERT pour le temps qu'il m'a accordé tout au long de cette thèse et pour l'amitié dont il a fait preuve. Ses précieux conseils ont été d'une aide inestimable tout au long de ces travaux. Merci également de m'avoir fait confiance en m'incluant dans un grand nombre de projets de recherche de grande qualité.

Le suivi de ces travaux a été réalisé par le Professeur Bruno VERGES et le Docteur Anatol KONTUSH que je remercie très sincèrement pour leur bienveillance et les discussions très instructives que nous avons eues.

Un grand merci au Professeur Khadija OUGUERRAM pour ses précieux conseils en métabolisme des lipides et en modélisation, sa confiance et son soutien. Merci également au Docteur Véronique FERCHAUD-ROUCHER, sans qui je n'aurais probablement jamais intégré le plateau technique de Spectrométrie de Masse.

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INRA 1280 « *Physiopathologie des Adaptations Nutritionnelles* ». Je souhaite remercier l'ensemble de l'unité, et en particulier les Professeurs Patricia PARNET et Dominique DARMAUN pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe.

Stéphanie et Audrey, veuillez trouver en ces quelques lignes ma très profonde reconnaissance pour votre aide et votre soutien dans la gestion de la plateforme de Spectrométrie de Masse. Votre rôle dans la réussite de ce projet est indiscutable. Nous formons une belle équipe enthousiaste et productive. C'est pour moi une grande fierté de travailler avec vous.

Ce projet n'aurait pu prendre corps sans l'aide des nombreux stagiaires que j'ai eu l'honneur d'encadrer ces dernières années, à commencer par Fanta et Raphaëlle. Ce fut un grand plaisir de travailler en votre compagnie durant vos stages de Master 1 & 2. Votre aide précieuse prend part à la concrétisation de ce travail. Une pensée amicale également pour Claire, Michelle, Vincent, Maxime, Marin, Thomas que j'ai pu encadrer de près ou de loin, mais aussi pour les nouveaux de cette année, Manon, Aurélie et Valentin. Je vous souhaite à tous réussite dans vos projets personnels et professionnels.

Un immense merci à Aurélie, Renaud, Luis et Zied avec qui j'ai eu l'honneur de travailler. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté, tant scientifiquement qu'amicalement. Je vous souhaite le meilleur, vous êtes des scientifiques et des amis de qualité.

Un grand merci à l'ensemble des collaborateurs avec qui j'ai pu réaliser de nombreux travaux de recherche extrêmement enrichissants. En particulier Elise, Etienne, Jean-Christophe et Bruno (SANOFI R&D) ; Maud, Antoine, Bertrand, Xavier, Karim, Cédric, David et François (INSERM U1087) ; Frédéric (INSERM U957) ; Karine, Maud, Nolwenn, François L. et François P. (INSERM U892) ; Julie, Mohammed et Patrick (CEISAM) et l'ensemble de l'équipe Biogenouest-Corsaire.

Enfin, je souhaite remercier l'ensemble du personnel de l'IRS-UN et de la SFR pour son accueil chaleureux, sa disponibilité et son aide dans la gestion quotidienne de la plateforme.

# **TABLES DES MATIÈRES**

<b>Liste des communications</b>	<b>1</b>
<b>Curriculum Vitæ</b>	<b>4</b>
<b>Abbréviations</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>11</b>
<b>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>11</b>
<b>1. ANALYSES BIOCHIMIQUES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE</b>	<b>13</b>
1.1. PRINCIPE	13
1.2. PREPARATION ET INTRODUCTION DES ECHANTILLONS	14
1.3. LES SOURCES D'IONS	22
1.4. LES ANALYSEURS EN MASSE	25
1.5. LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM	29
1.6. LES DETECTEURS	34
1.7. CONCLUSION	35
<b>2. LES CONSTITUANTS DES LIPOPROTÉINES</b>	<b>36</b>
2.1. GENERALITES SUR LES LIPOPROTEINES	36
2.2. LES LIPIDES	37
2.3. LES APOLIPOPROTEINES	41
<b>3. LE MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES</b>	<b>46</b>
3.1. GENERALITES	46
3.2. LA VOIE EXOGENE	47
3.3. LA VOIE ENDOGENE	50
3.3. LA VOIE TRANSPORT INVERSE	52
<b>4. METHODES DE MARQUAGE POUR L'ANALYSE DES FLUX</b>	<b>55</b>
4.1. CONCEPTIONS DES ETUDES CINETIQUES	55
4.2. CHOIX DU TRACEUR ENDOGENE	58

4.3.	ISOTOPOLOGIE, ISOTOPOMERIE ET EFFET ISOTOPIQUE	61
4.4.	MESURE DES ENRICHISSEMENTS	65
4.5.	ANALYSES CINETIQUES ET MODELISATION	66
<b>5.</b>	<b>APPORTS METHODOLOGIQUES</b>	<b>72</b>
5.1.	MARQUEURS CONVENTIONNELS DU METABOLISME DES LIPOPROTEINES ET METHODES EMPIRIQUES DE MESURE	72
5.2.	ANALYSES DES APOLIPOPROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	74
5.3.	ANALYSES DES LIPIDES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	78
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>		<b>83</b>
<b>TRAVAUX PERSONNELS</b>		<b>85</b>
	<b>ARTICLE 1</b> : EFFECTS OF EXTENDED-RELEASE NICOTINIC ACID ON APOLIPOPROTEIN (a) KINETICS IN HYPERTRIGLYCERIDEMIC PATIENTS	85
	<b>ARTICLE 2</b> : PCSK9 INHIBITION WITH ALIROCUMAB EFFICIENTLY REDUCES LIPOPROTEIN (a) LEVELS IN NON-HUMAN PRIMATES BY LOWERING APOLIPOPROTEIN (A) PRODUCTION RATE	101
	<b>ARTICLE 3</b> : MULTIPLEXED PEPTIDE ANALYSIS FOR KINETIC MEASUREMENTS OF MAJOR HUMAN APOLIPOPROTEINS BY LC/MS/MS	120
	<b>ARTICLE 4</b> : PLASMA PCSK9 MEASUREMENT BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY AND COMPARISON WITH CONVENTIONAL ELISA	135
	<b>ARTICLE 5</b> : FENOFIBRATE DECREASES PLASMA CERAMIDES IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS: A NOVEL MARKER FOR CVD?	144
	<b>ARTICLE 6</b> : COMPARISON OF GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY AND GAS CHROMATOGRAPHY-COMBUSTION-ISOTOPE RATIO MASS SPECTROMETRY ANALYSIS FOR IN VIVO ESTIMATES OF METABOLIC FLUXES	159
	<b>ARTICLE 7</b> : STABLE ISOTOPE KINETIC STUDY OF APOLIPOPROTEIN M	165
<b>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</b>		<b>207</b>
<b>REFERENCES</b>		<b>156</b>
<b>Annexe A : Exemples de structures chimiques des lipides</b>		<b>222</b>
<b>Annexe B : Résumés des publications collaboratives</b>		<b>225</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Représentation schématique des niveaux de caractérisation des systèmes biologiques en sciences « omiques » _____	11
<b>Figure 2 :</b> Représentation schématique d'un système de spectrométrie de masse _____	13
<b>Figure 3 :</b> Quelques exemples de méthodes de préparation des échantillons biologiques _____	16
<b>Figure 4 :</b> Exemple d'hydrolyse et de dérivation pour le cholestérol estérifié (A) et de protéolyse enzymatique pour une protéine (B) _____	17
<b>Figure 5 :</b> Exemples de chromatogrammes _____	21
<b>Figure 6 :</b> Schéma d'une source d'ions à impact électronique et exemple de spectre de masse généré _____	23
<b>Figure 7 :</b> Schéma d'une source électrospray et exemples de spectres de masse _____	24
<b>Figure 8 :</b> Spectres de masse obtenus pour la Leucine Enkephaline à basse et haute résolutions ____	25
<b>Figure 9 :</b> Principe du quadripôle _____	26
<b>Figure 10 :</b> Principe du temps de vol en mode réflectron _____	27
<b>Figure 11 :</b> Principe du secteur magnétique à simple focalisation _____	28
<b>Figure 12 :</b> Principe de la spectrométrie de masse en tandem, cas du triple quadripôle _____	29
<b>Figure 13 :</b> Exemple de mode de balayage sur un mélange de 10 triglycérides (TG) séparés par UPLC et ionisés par ESI positif _____	32
<b>Figure 14 :</b> Elucidation structurale d'une phosphatidylcholine (glycérophospholipide) par MS/MS (ESI positif et négatif). _____	33
<b>Figure 15 :</b> Elucidation structural d'un peptide par MS/MS (ESI positif) _____	34
<b>Figure 16 :</b> Représentation schématique d'une lipoprotéine _____	36
<b>Figure 17 :</b> Diversité des lipides présent dans le plasma humain et réseaux de connections entre les différentes catégories lipidiques _____	38
<b>Figure 18 :</b> Réseau métabolique des sphingolipides _____	39

<b>Figure 19:</b> Représentation schématique de la lipoprotéine (a)	44
<b>Figure 20 :</b> Vue globale du métabolisme des lipoprotéines	47
<b>Figure 21 :</b> Représentation schématique de la voie métabolique exogène	49
<b>Figure 22 :</b> Représentation schématique de la voie métabolique endogène	51
<b>Figure 23 :</b> Représentation schématique de la voie de transport inverse du cholestérol	54
<b>Figure 24 :</b> Cinétiques de VLDL obtenues après administration exogène de VLDL marquées à l'iode 125 ou l'administration endogène de $^2\text{H}_3$ -leucine (enrichissements mesurés pour l'apoB100 des VLDL)	56
<b>Figure 25 :</b> Cinétiques obtenues pour l'apoB100 (VLDL) et l'apoA-I (HDL) après administration de la $^2\text{H}_3$ -leucine comme traceur (tracé = leucine) en protocole d'infusion continue (A) ou de bolus (B)	58
<b>Figure 26 :</b> Répartition théorique des isotopologues et isotopomères d'un furanne (4 carbones) après un marquage au $^{13}\text{C}$	62
<b>Figure 27 :</b> Illustration de l'effet isotopique avec l'hydrogène (A) ou le carbone (B) et importance du choix du traceur (cas de la leucine) (C).	64
<b>Figure 28 :</b> Représentation schématique de la notion de compartiment	68
<b>Figure 29 :</b> Quelques exemples de modèles à plusieurs compartiments décrivant les cinétiques de l'apoA-I des HDL (A), (B) et le métabolisme de l'apoB100 des VLDL, IDL et LDL (C)	71
<b>Figure 30 :</b> Comparaison des approches méthodologiques utilisées pour l'analyse des apolipoprotéines	77
<b>Figure 31 :</b> Exemple de chromatogrammes obtenus en lipidomique à partir d'un échantillon de plasma analysé en ESI positif et négatif (mode phase inverse, détection Q-TOF)	79
<b>Figure 32 :</b> Exemples de représentations graphiques statistiques multivariées utilisées en lipidomique	80

# **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1 :</b> Caractéristiques principales des principaux analyseurs en masse _____	25
<b>Tableau 2 :</b> Résumé des modes de balayage utilisés en spectrométrie de masse _____	31
<b>Tableau 3 :</b> Caractéristiques principales des lipoprotéines _____	37
<b>Tableau 4 :</b> Répartition des principaux lipides plasmatiques détectables en spectrométrie de masse et fonctions principales _____	40
<b>Tableau 5 :</b> Principales propriétés des apolipoprotéines _____	45
<b>Tableau 6 :</b> Principaux isotopes des éléments utilisés lors des études cinétiques _____	59
<b>Tableau 7 :</b> Exemple d'adduits majoritairement observés lors de l'ionisation des lipides en ESI et fragments caractéristiques en mode MS/MS ou MS <sup>E</sup> _____	81



# **LISTE DES COMMUNICATIONS**

## **Publications des travaux personnels**

---

**Croyal M**, Ouguerram K, Passard M, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Billon-Crossouard S, de Gouville AC, Lambert G, Krempf M, Nobécourt E. Effects of extended-release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2015**, 35: 2042-2047.

**Croyal M**, Fall F, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Zaïr Y, Ouguerram K, Krempf M, Nobécourt E. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J Lipid Res*, **2016**, 57: 509-515.

**Croyal M**, Bourgeois R, Ouguerram K, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Nguyen P, Krempf M, Ferchaud-Roucher V, Nobécourt E. Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry analysis for in vivo estimates of metabolic fluxes. *Anal Biochem*, **2016**, 500: 63-65.

**Croyal M**, Fall F, Krempf M, Thédrez A, Ouguerram K, Ferchaud-Roucher V, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Mata P, Alonso R, Lambert G and Nobécourt E. Plasma PCSK9 measurement by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with conventional ELISA. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2017**, 1044: 24-29.

**Croyal M**, Kaabia Z, León L, Ramin-Mangata S, Baty T, Fall F, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Hollstein T, Sullivan DR, Nobecourt E, Lambert G and Krempf M. Fenofibrate decreases plasma ceramides in type 2 diabetic patients: a novel marker for CVD? Accepted dans le journal *Diabetes and Metabolism* le 13 avril 2017.

**Croyal M**, Billon-Crossouard S, Goulitquer S, Luis Leon, Fall F, Chétiveaux M, Aguesse A, Moyon T, Ouguerram K, Nobécourt E and Krempf M. Stable isotope kinetic study of Apolipoprotein M. *En Rédaction*.

**Croyal M**, Tran TTT, Blanchard RH, Le Bail JC, Villard EF, Poirier B, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Ramin-Mangata S, Bourane S, Thedrez A, Krempf M, Boixel C, Lambert G, and Guillot E. PCSK9 inhibition with Alirocumab efficiently reduces lipoprotein (a) levels in non-human primates by lowering apolipoprotein (a) production rate. *En Rédaction*.

## Communications orales

---

**International Symposium of Artherosclerosis (ISA), Amsterdam, Hollande, 23-26 mai 2015.** *"Effect of long-acting nicotinic acid on apolipoprotein (a) turnover in hypertriglyceridemic patients"*.

**Réseau Français de Métabolomique et de Fluxomique (RFMF), Lille, France, 9-11 juin 2015.** *"Etude des marqueurs protéiques et de leurs flux physiologiques par LC-MS/MS : cas de l'apolipoprotéine (a)"*.

**Nouvelle Société Française d'Arthérosclérose (NSFA), Biarritz, France, 25-27 juin 2015.** *"Effect of long-acting nicotinic acid on apolipoprotein (a) turnover in hypertriglyceridemic patients"*.

**Journée scientifique Corsaire-Biogenouest, Nantes, France, 18 décembre 2015.** *"Multiplexed peptide analysis for static and kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC-MS/MS"*.

**Journée scientifique Waters, Paris, France, 4 octobre 2016.** *"Multiplexed peptide analysis for static and kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC-MS/MS"*.

**Gen2bio 2017, Nantes, France, 14 mars 2017.** *"Analyse multiplaxée des flux protéiques par l'utilisation d'isotopes stables et de la LC-MS/MS : applications aux apolipoprotéines"*.

**European Atherosclerosis Symposium (EAS), Prague, République Tchèque, 23-26 avril 2017.** *"Alirocumab efficiently reduces Lp(a) levels by lowering apolipoprotein (a) production rate in non-human primates"*.

## Communications affichées

---

**Croyal M et al., Gen2bio 2015, La Baule, France, 26 mars 2015.** *"Etude des marqueurs protéiques et de leurs flux physiologiques par LC-MS/MS : cas de l'apolipoprotéine (a)"*.

**Croyal M et al., Nouvelle Société Française d'Arthérosclérose (NSFA), Biarritz, France, 25-27 juin 2015.** *"Comparaison de la GC-MS et de la GC-C-IRMS pour l'étude cinétique du cholestérol et de ses dérivés chez le chien après une perfusion continue de <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-acétate"*.

**Croyal M *et al.*, European Atherosclerosis Symposium (EAS), Innsbruck, Autriche, 28 mai-1er juin 2016. "Stable isotope kinetic study of Apolipoprotein M in healthy subjects".**

**Croyal M *et al.*, International Symposium on Isotopomers (ISI), Nantes, France, 3-7 octobre 2016. "Comparison of GC-MS and GC-C-IRMS analysis for *in vivo* estimates of metabolic fluxes".**

# CURRICULUM VITÆ

## Formation

---

- ❖ 2014-2017 : Thèse de doctorat (Biologie-Santé). Université de Nantes.
- ❖ 2003-2004 : Master 2 (ex D.E.S.S.) « Méthodes Spectroscopiques d'Analyses et de Caractérisation Physico-Chimique ». Université de Rennes I.
- ❖ 2002-2003 : Maitrise de Chimie option « Chimie moléculaire ». Université de Rennes I.

## Expériences Professionnelles

---

- ❖ Depuis 2013 : Ingénieur Hospitalier et doctorant (depuis 2014), plateau de Spectrométrie de Masse du Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH), INRA UMR 1280, Nantes (44).
- ❖ 2010-2013 : Directeur d'études et responsable du laboratoire analytique, C.RIS pharma, Saint-Malo (35).
- ❖ 2004-2010 : Ingénieur en Spectrométrie de Masse, Bioprojet Biotech, département « *Bioanalysis & Drug Metabolism and Pharmacokinetics* », Saint-Grégoire (35).

## Encadrement / Enseignement (CRNH)

---

- ❖ Cours magistraux de Spectrométrie de Masse (6 heures / an) : Master 1 et Master 2.
- ❖ Encadrement de stagiaires : 1 Licence 3, 2 Masters 1, 3 Masters 2.
- ❖ Gestion du plateau technique et encadrement de deux assistantes ingénieures.

## Publications (liste complète)

---

- ❖ Croyal M, Kaabia Z, León L, Ramin-Mangata S, Baty T, Fall F, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Hollstein T, Sullivan DR, Nobecourt E, Lambert G and Krempf M. Fenofibrate decreases plasma ceramides in type 2 diabetic patients: a novel marker for CVD? *Diabetes Metab*, **2017**, doi:10.1016/j.diabet.2017.04.003.
- ❖ Fitahia EM, Croyal M, Raheiniaina CE, Ferchaud-Roucher V, and Nazih H. High-Resolution Mass Spectrometry Unravels a Broad Range of Bioactive Lipid Species in *Octopus cyanea* and *Loligo sp.* By-products from Southwestern Madagascar. *Waste Biomass Valor*, **2017**, doi:10.1007/s12649-017-9933-x.

- ❖ Lambert G, Thedrez A, Croyal M, Ramin-Mangata S, Couret D, Diotel N, Nobécourt-Dupuy E, Krempf M, LeBail JC, Poirier B, Blankenstein J, Villard EF, Guillot E. The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies. *Clin Sci (Lond)*, **2017**, 131: 261-268.
- ❖ Honório de Melo P, de Sa Braga Oliveira A, Ferchaud-Roucher V, Croyal M, Aguesse A, Grit I, Ouguerram K, Lopes de Souza S, Kaeffer B, Bolaños-Jiménez F. Maternal protein-restriction during gestation and lactation in the rat results in increased brain levels of kynurenine and kynurenic acid in their adult offspring. *J Neurochem*, **2017**, 140: 68-81.
- ❖ Croyal M, Fall F, Krempf M, Thédrez A, Ouguerram K, Ferchaud-Roucher V, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Mata P, Alonso R, Lambert G and Nobécourt E. Plasma PCSK9 measurement by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with conventional ELISA. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2017**, 1044: 24-29.
- ❖ Alonso R, Mata P, Muniz O, Fuentes-Jimenez F, Diaz LJ, Zambon D, Tomas M, Moyon T, Croyal M, Thedrez A, Lambert G. Plasma PCSK9 and Lipoprotein (a) levels are two predictors of coronary artery calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **2016**, 254: 249-253.
- ❖ Villard EF, Thedrez A, Blankenstein J, Croyal M, Thi-Thu-Trang T, Poirier B, Le Bail JC, Illiano S, Nobécourt E, Krempf M, Marais AD, Blom DJ, Muslin AJ, Guillot E, Lambert G. PCSK9 modulates the secretion but not the cellular uptake of Lipoprotein (a) ex vivo: an effect blunted by alirocumab. *JACC Basic Transl Sci*, **2016**, 1 : 419-427.
- ❖ Tavori H, Christian DC, Minnier J, Plubell D, Shapiro MD, Yeang C, Giunzioni I, Croyal M, Duell PB, Lambert G, Tsimikas S, Fazio S. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ Res*, **2016**, 119 : 29-35.
- ❖ Rimbart A, Pichelin M, Lecointe S, Marrec M, Le Scouarnec S, Barrak E, Croyal M, Krempf M, Le Marec H, Redon R, Schott JJ, Magré J, Cariou B. Identification of novel APOB mutations by targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of familial hypobetalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, **2016**, 250 : 52-56.
- ❖ Charpentier M, Croyal M, Carbonnelle D, Fortun A, Florenceau L, Rabu C, Krempf M, Labarrière N, Lang F. IRES-dependent translation of the long non coding RNA meloe in

melanoma cells produces the most immunogenic MELOE antigens. *Oncotarget*, **2016**, doi:10.18632/oncotarget.10923.

- ❖ Thedrez A, Sjouke B, Passard M, Prampart-Fauvet S, Guédon A, Croyal M, Dallinga-Thie G, Peter J, Blom D, Ciccarese M, Cefalù AB, Pisciotta L, Santos RD, Aversa M, Raal F, Pintus P, Cossu M, Hovingh K, Lambert G. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Inhibition for Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2016**, 36: 1647-1650.
- ❖ Croyal M, Bourgeois R, Ouguerram K, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Nguyen P, Krempf M, Ferchaud-Roucher V, Nobécourt E. Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry analysis for in vivo estimates of metabolic fluxes. *Anal Biochem*, **2016**, 500: 63-65.
- ❖ Croyal M, Fall F, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Zair Y, Ouguerram K, Krempf M, Nobécourt E. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J Lipid Res*, **2016**, 57: 509-515.
- ❖ Alves AC, Etxebarria A, Medeiros AM, Benito-Vicente A, Thedrez A, Passard M, Croyal M, Martin C, Lambert G, Bourbon M. Characterization of the first PCSK9 gain of function homozygote. *J Am Coll Cardiol*, **2015**, 66: 2152-2154.
- ❖ Croyal M, Ouguerram K, Passard M, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Billon-Crossouard S, de Gouville AC, Lambert G, Krempf M, Nobécourt E. Effects of extended-release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2015**, 35: 2042-2047.
- ❖ Dauvilliers Y, Delallée N, Jaussent I, Scholz S, Bayard S, Croyal M, Schwartz JC, Robert P. Normal cerebrospinal fluid histamine and tele-methylhistamine levels in hypersomnia conditions. *Sleep*, **2012**, 35: 1359-1366.
- ❖ Croyal M, Dauvilliers Y, Labeeuw O, Capet M, Schwartz JC, Robert P. Histamine and tele-methylhistamine quantification in cerebrospinal fluid from narcoleptic subjects by LC-MS/MS with pre-column derivatization. *Anal Biochem*, **2011**, 409: 28-36.
- ❖ Bassetti CL, Baumann CR, Dauvilliers Y, Croyal M, Robert P, Schwartz JC. Cerebrospinal fluid histamine levels are decreased in patients with narcolepsy and excessive daytime sleepiness of other origin. *J of Sleep Res*, **2010**, 19: 620-623.

# ABBREVIATIONS

<b>ABC :</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>ACAT :</b>	Acyl-CoA cholestérol acyltransférase
<b>ACP :</b>	Analyse en composantes principales
<b>ADN / ARN :</b>	Acide désoxyribonucléique / Acide ribonucléique
<b>AG :</b>	Acide gras
<b>APE :</b>	<i>Atom percent excess</i>
<b>Apo :</b>	Apolipoprotéine
<b>APR :</b>	Taux de production absolue, <i>Absolute production rate</i>
<b>CD36 :</b>	<i>Cluster of differentiation 36</i>
<b>CETP :</b>	<i>Cholesterylester transfer protein</i>
<b>CI :</b>	Ionisation chimique, <i>Chemical ionization</i>
<b>CL / CE :</b>	Cholestérol libre / Cholestérol estérifié
<b>CM :</b>	Chylomicron
<b>CT :</b>	Cholestérol total
<b>DG :</b>	Diglycéride, diacylglycérol
<b>DGAT :</b>	Diacylglycérol transférase
<b>EI :</b>	Ionisation par impact électronique, <i>Electron impact</i>
<b>ELISA :</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>ESI :</b>	Ionisation par électrospray, <i>Electrospray ionization</i>
<b>FATP :</b>	<i>Fatty acid transport protein</i>
<b>FCR :</b>	Taux de catabolisme fractionné, <i>Fractional catabolic rate</i>
<b>FPLC :</b>	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
<b>FSR :</b>	Taux de synthèse fractionné, <i>Fractional synthetic rate</i>
<b>GC-C-IRMS :</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un four à combustion et à la spectrométrie de masse de rapport isotopique, <i>Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry</i>
<b>GC-MS :</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
<b>HDL :</b>	Lipoprotéine de haute densité, <i>High-density lipoprotein</i>
<b>HDL-C :</b>	HDL cholestérol
<b>HL :</b>	<i>Hepatic lipase</i>

<b>HSPG/LRP :</b>	<i>Heparin sulfate proteoglycan/lipoprotein-receptor related protein</i>
<b>IDL :</b>	Lipoprotéine de densité intermédiaire, <i>Intermediate-density lipoprotein</i>
<b>IM :</b>	Mobilité ionique, <i>Ion mobility</i>
<b>LCAT :</b>	Lécithine-cholestérol acyltransférase
<b>LC-HRMS :</b>	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution, <i>Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry</i>
<b>LC-MS/MS :</b>	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, <i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
<b>LDL :</b>	Lipoprotéine de basse densité, <i>Low-density lipoprotein</i>
<b>LDL-C :</b>	LDL cholestérol
<b>LDLR :</b>	Récepteur aux LDL
<b>Lp(a) :</b>	Lipoprotéine (a)
<b>LPL :</b>	Lipoprotéine lipase
<b>LRP :</b>	<i>Lipoprotein-related receptor protein</i>
<b>LXR :</b>	<i>Liver X receptor</i>
<b>m/z :</b>	Rapport masse sur charge
<b>MG :</b>	Monoglycéride, monoacylglycérol
<b>MGAT :</b>	Monoacylglycérol acyltransférase
<b>MPE :</b>	<i>Mol percent excess</i>
<b>MRM :</b>	<i>Multiple reaction monitoring</i>
<b>MS<sup>E</sup> :</b>	Spectrométrie de masse à énergie, <i>Mass spectrometry energy</i>
<b>MTP :</b>	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
<b>NPC1L1 :</b>	<i>Niemann-Pick C1-like protein 1</i>
<b>OPLS :</b>	<i>Orthogonal Partial Least Squares</i>
<b>PCR :</b>	Réaction en chaîne par polymérase, <i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PCSK9 :</b>	Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9
<b>PL :</b>	Phospholipides
<b>PLTP :</b>	<i>Phospholipid transfer protein</i>
<b>ppm :</b>	Partie par million
<b>PR :</b>	Taux de production, <i>Production rate</i>
<b>Q, QqQ :</b>	Analyseur quadripolaire, triple quadripôle
<b>Q-TOF :</b>	Analyseur hybride quadripôle-Temps de vol ( <i>Time of flight</i> )
<b>RMN :</b>	Résonance magnétique nucléaire

<b>RT :</b>	Temps de résidence, <i>Residence time</i> (modélisation) ou Temps de rétention, <i>Retention time</i> (chromatographie)
<b>SFC :</b>	Chromatographie en fluide supercritique, <i>Supercritical fluid chromatography</i>
<b>SIM ou SIR :</b>	<i>Single ion monitoring</i> ou <i>Single ion reaction</i>
<b>SPE :</b>	<i>Solid phase extraction</i>
<b>SR-BI :</b>	<i>Scavenger receptor class B member 1</i>
<b>TG :</b>	Triglycéride, triacylglycérol
<b>TRL :</b>	Lipoprotéine riche en triglycérides, <i>Triglyceride-rich lipoprotein</i>
<b>TTR :</b>	<i>Tracer-to-tracee ratio</i>
<b>UPC<sup>2</sup> :</b>	Chromatographie de convergence ultra performante, <i>Ultra performance convergence chromatography</i>
<b>UPLC :</b>	Chromatographie liquide ultra performante, <i>Ultra-performance liquid chromatography</i>
<b>VLDL :</b>	Lipoprotéine de très basse densité, <i>Very-low-density lipoprotein</i>



**INTRODUCTION**

**GÉNÉRALE**

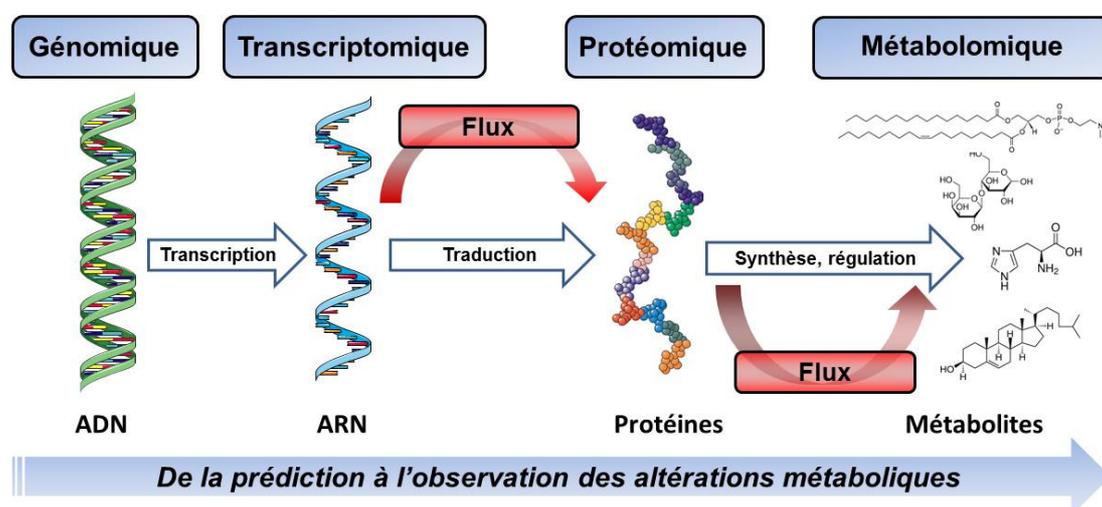


**Les maladies cardiovasculaires** – Les maladies cardiovasculaires, et en particulier les maladies coronariennes, constituent aujourd’hui l’une des principales causes de décès à travers le monde. Les altérations du métabolisme des lipides et des lipoprotéines augmentent le risque de complications en favorisant le développement de l’athérosclérose (Kannel 1985). L’analyse globale des constituants des lipoprotéines plasmatiques, incluant les lipides et les protéines en charge de leur transport et de leur métabolisme, est essentielle à la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans ces dérèglements. En outre, parmi la grande diversité chimique que représentent les lipides (Quehenberger *et al.* 2010), certains semblent être d’intéressants modulateurs associés à ces pathologies (Lam & Shui 2013).

**Les sciences « omiques »** – Ces dernières décennies, l’émergence de nouvelles techniques analytiques de très haute précision a contribué au développement des sciences « omiques » dont le principal objectif reste la recherche de marqueurs prédictifs des pathologies. Le principe consiste à étudier les modulations de différentes espèces moléculaires au sein d’un organisme et dans un système défini comme un état physiologique ou pathologique. La caractérisation complète des systèmes biologiques peut ainsi se faire selon les quatre niveaux que sont la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique (Roux *et al.* 2011). Comme illustré sur la **Figure 1**, les trois premiers sont respectivement associés à l’analyse globale du génome (ADN ou acide désoxyribonucléique), du transcriptome (ARN ou acide ribonucléique) et du protéome (protéines). Le terme métabolome associé à la métabolomique reflète, tout comme le protéome, les événements biologiques passés, alors que le génome et le transcriptome reflètent l’information fonctionnelle réelle et potentielle de l’organisme (Oliver *et al.* 1998). De manière générale, le métabolome est relatif aux composés de petits poids moléculaires ne faisant pas partie de la famille des oligonucléotides (ADN et ARN) ou des protéines. Dans le sang, près de 70 % de ces molécules étant des lipides (Quehenberger *et al.* 2010), l’analyse globale du lipidome, ou lipidomique, a émergé comme une discipline indépendante (Lam & Shui 2013 ; Han 2016). A noter que depuis le début des années 2000, les évolutions technologiques, notamment en spectrométrie de masse, ont permis de considérablement accroître le nombre de travaux associés aux analyses métabolomiques et lipidomiques (Roux *et al.* 2011 ; Lam & Shui 2013 ; Han 2016).

**Les études de flux** – La caractérisation complète de nouveaux marqueurs nécessite la compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans leur transport, leur production

et leur dégradation. L'analyse des flux métaboliques *via* l'utilisation de précurseurs de synthèse enrichis en isotopes stables ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ) permet l'obtention de ces précieuses informations (Lichtenstein *et al.* 1990 ; Foster *et al.* 1993 ; Crown & Antoniewicz 2013). *In vivo*, ces études cinétiques permettent d'étudier les taux de synthèse et de dégradation des constituants d'intérêts et de mettre en évidence les dérèglements engendrés par une pathologie, ainsi que l'efficacité d'un traitement pharmaceutique ou nutritionnel. De façon intégrée, ces analyses dynamiques aident à l'interprétation des paramètres modulés à la suite d'un dérèglement physiopathologique (état A *versus* état B). Aujourd'hui, seule la spectrométrie de masse permet de mesurer en conditions physiologiques l'ensemble des paramètres impactés par l'incorporation d'isotopes stables non radioactifs.



**Figure 1 :** Représentation schématique des niveaux de caractérisation des systèmes biologiques en sciences « omiques » (images Servier, adapté de Roux *et al.* 2011)

**Objectifs** – L'objectif principal de ce travail a été de développer des méthodes analytiques originales basées sur la spectrométrie de masse, pour affiner la caractérisation statique et dynamique des principaux constituants des lipoprotéines plasmatiques humaines. En combinant différents outils de la bioanalyse et de la biochimie à la spectrométrie de masse, nous avons cherché à accroître l'efficacité de ces méthodes, tout en conservant leur robustesse, afin d'accéder le plus rapidement possible à un grand nombre d'informations physiologiques. Les limites de ces méthodes ont également été explorées avant d'être appliquées à des études de cas concrets, telles que les dyslipidémies (diabète, hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie, obésité) ou l'efficacité de traitements hypolipémiants.

**Plan d'étude** – Ce rapport est stratifié en plusieurs sections. La première, bibliographique, permettra de résumer et de rappeler les grandes lignes nécessaires à la compréhension des travaux réalisés au travers de cinq chapitres distincts : 1) les principes fondamentaux de la spectrométrie de masse en biochimie et en santé humaine (cette partie instrumentale ne sera donc pas exhaustive mais appliquée), 2) les composants moléculaires majeurs des lipoprotéines plasmatiques humaines, 3) les flux métaboliques de ces dernières, 4) les méthodes de marquage utilisées pour l'analyse des flux, et 5) l'apport de la spectrométrie de masse dans l'analyse et la recherche de paramètres biochimiques d'intérêt dans les pathologies métaboliques et cardiovasculaires. La seconde partie énoncera de manière plus détaillée les principaux objectifs fixés pour ces travaux de thèse, alors que la troisième présentera, au travers de sept articles scientifiques (acceptés ou en soumission), les travaux expérimentaux réalisés lors de ce projet. Enfin, la quatrième et dernière partie aura pour objectif de discuter l'ensemble des éléments présentés tout au long de cette thèse et d'énoncer les principales perspectives qui en découlent.



**ÉTUDE**

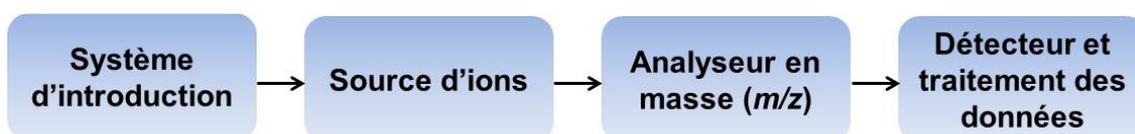
**BIBLIOGRAPHIQUE**



# 1. ANALYSES BIOCHIMIQUES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

## 1.1. Principe

La spectrométrie de masse est une technique analytique de premier ordre en recherche biomédicale car elle permet la détection de biomolécules à leurs niveaux physiologiques (Griffiths *et al.* 2001). Depuis l'introduction de traceurs enrichis en isotopes stables dans les études de flux, elle seule est en mesure d'évaluer les niveaux d'enrichissement. En effet, son principe réside dans la détection et l'identification structurale d'espèces élémentaires ou moléculaires chargées (ions) en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) exprimés en Thompson (Th). Les systèmes, bien que très variés, peuvent se découper en quatre compartiments distincts (**Figure 2**) consistant en un système d'introduction des molécules, suivi d'une source permettant de les transformer en ions gazeux, d'un ou plusieurs analyseurs séparant ces ions selon leur rapport  $m/z$ , d'un détecteur permettant de les compter et enfin d'un système de traitement des informations pour l'enregistrement des spectres de masse.



**Figure 2** : Représentation schématique d'un système de spectrométrie de masse

Ces trois dernières décennies ont été marquées par l'essor de la spectrométrie de masse dans la recherche biologique et clinique, notamment grâce au développement des sources d'ions et des analyseurs en masse, et, dans une moindre mesure, grâce au développement des systèmes d'introduction (Griffiths *et al.* 2001). En effet, le développement de nouvelles sources d'ionisation dites « douces » a permis l'analyse directe de nombreux composés, sans dérivation préalable, améliorant considérablement les temps et les coûts d'analyse. Le développement des analyseurs a permis de mesurer plus rapidement, plus précisément et de façon plus sensible une large gamme de composés de poids moléculaires très variés. Enfin, les améliorations apportées aux systèmes d'introduction, essentiellement chromatographiques, ont permis de diminuer considérablement les temps d'analyse tout en améliorant la résolution et la spécificité.

Ce chapitre a pour objectif de répertorier les techniques utilisées durant ces travaux de recherche avant de les présenter de façon intégrée à nos études. Pour la réalisation des travaux présentés, nous avons utilisé la chromatographie en phases liquide ou gazeuse comme système d'introduction, l'électrospray et l'impact électronique comme sources d'ionisation, et des analyseurs en masse de type quadripolaire, à temps de vol et à secteur magnétique.

## 1.2. Préparation et introduction des échantillons

### 1.2.1. Préparation des échantillons biologiques

La fiabilité d'une méthode analytique est fortement liée à la qualité de la préparation de l'échantillon biologique. Cette dernière permet de répondre à deux objectifs majeurs à savoir l'extraction plus ou moins spécifique des composés d'intérêt (analytes) ou l'élimination des interférences présentes dans les matrices biologiques complexes, et la compatibilité physico-chimique et physiologique (concentration, stabilité) des analytes avec la méthode analytique désirée.

**Extraction des analytes** – De nombreuses méthodes d'extraction existent suivant la nature des composés à analyser et de l'échantillon biologique. Avant toute chose, ce dernier doit être le plus homogène possible. Ainsi, le plasma ou le sérum peuvent être isolés du sang total, les tissus sont homogénéisés dans un tampon physiologique et certains bio-fluides peuvent être dilués dans une solution tampon. A noter que l'échantillon biologique est de type aqueux quelle que soit sa composition. Plusieurs stratégies, seules ou en combinaison, peuvent ensuite être envisagées suivant le niveau de spécificité désiré et la compatibilité expérimentale (**Figure 3**).

Méthodes physiques : Elles regroupent les méthodes de filtration et de dialyse, l'ultracentrifugation, ou la simple dilution ([Havel et al. 1955](#) ; [Williams et al. 2005](#) ; [Zhou et al. 2013](#)). Ces méthodes, peu spécifiques, sont très souvent utilisées en combinaison avec une autre technique plus sélective. La chromatographie semi-préparative peut également être utilisée afin de fractionner une matrice biologique complexe. A titre d'exemple, des macro-complexes protéiques comme les lipoprotéines sont isolables du plasma soit par ultracentrifugation soit par filtration sur gel sur des systèmes de chromatographie d'exclusion stérique (FPLC, *fast protein liquid chromatography*) ([Chétiveaux et al. 2004](#)).

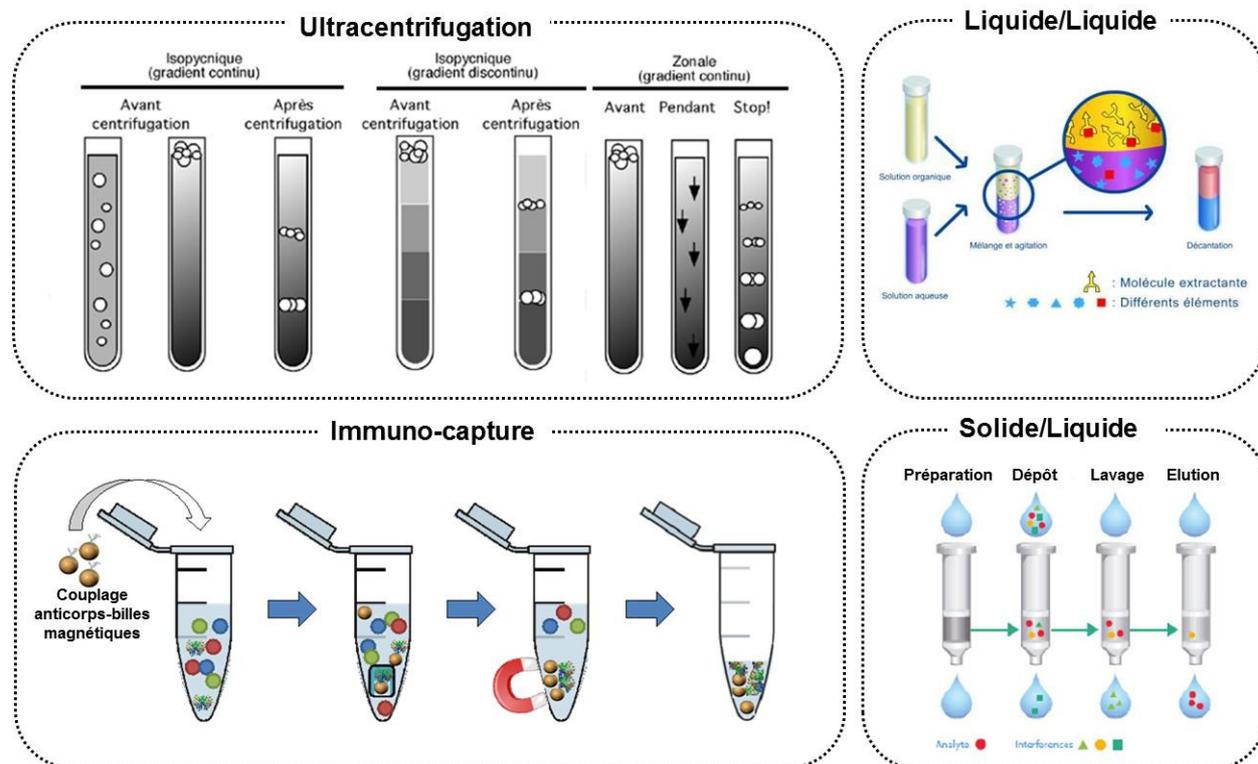
La précipitation : Elle consiste à ajouter un solvant organique miscible à l'eau (acétonitrile, méthanol...), et par conséquent à l'échantillon biologique, conduisant à la précipitation de la plupart des macromolécules telles que les protéines. Le précipité pourra ainsi être isolé et éliminé par simple centrifugation. Bien que peu sélective, cette technique est plébiscitée pour les analyses « non-ciblées » en métabolomique pour sa simplicité et son universalité. En effet, elle permet l'exclusion de composés interférents sans extraire de façon spécifique une classe particulière de molécules (Dunn *et al.* 2011).

L'extraction en phases liquide/liquide : Elle consiste à transférer un composé d'une phase aqueuse à une phase organique en utilisant deux solvants non miscibles. Cette technique implique donc l'utilisation de solvants organiques non miscibles à l'eau (hexane, chloroforme, éther...). Les molécules organiques vont ainsi migrer préférentiellement vers cette nouvelle phase facilement isolable de l'échantillon aqueux par centrifugation. Cette technique est souvent utilisée pour les méthodes quantitatives « ciblées ». En effet, suivant le solvant choisi, elle permet l'extraction spécifique d'une classe particulière de molécules. Les lipides étant insolubles dans l'eau, cette technique est aussi plébiscitée pour les analyses lipidomiques « non-ciblées » (Bligh & Dyer 1959 ; Löfgren *et al.* 2012).

L'extraction en phases solide/liquide : Le principe de cette technique est analogue à la chromatographie de partage. Aujourd'hui, de nombreuses phases stationnaires ont été développées, permettant des extractions de plus en plus ciblées. Elle permet également l'extraction de composés polaires difficilement extractibles par les méthodes liquide/liquide. L'extraction se déroule généralement sur cartouche et suivant quatre étapes : le conditionnement et l'équilibration de la phase stationnaire, le chargement de l'échantillon, le lavage de la cartouche et enfin l'élution spécifique des analytes. Cette technique, très sélective, peut également être utilisée en ligne sur des équipements chromatographiques (Franke & de Zeeuw 1998 ; Humbert 2010), et est principalement employée pour les méthodes quantitatives « ciblées ».

L'immuno-affinité : Le principe de cette technique est analogue à l'extraction en phases solide/liquide mais majoritairement appliquée à l'analyse des protéines. Le principe est basé sur le greffage d'un ou plusieurs anticorps sur une surface. Lors du contact avec l'échantillon, le ou les composés ciblés (antigènes) vont se coupler à l'anticorps spécifique. Après lavage, le couple anticorps-antigène peut être libéré et dissocié pour l'analyse. Deux approches existent : la déplétion qui consiste à fixer les interférences sur les anticorps et à analyser les échantillons

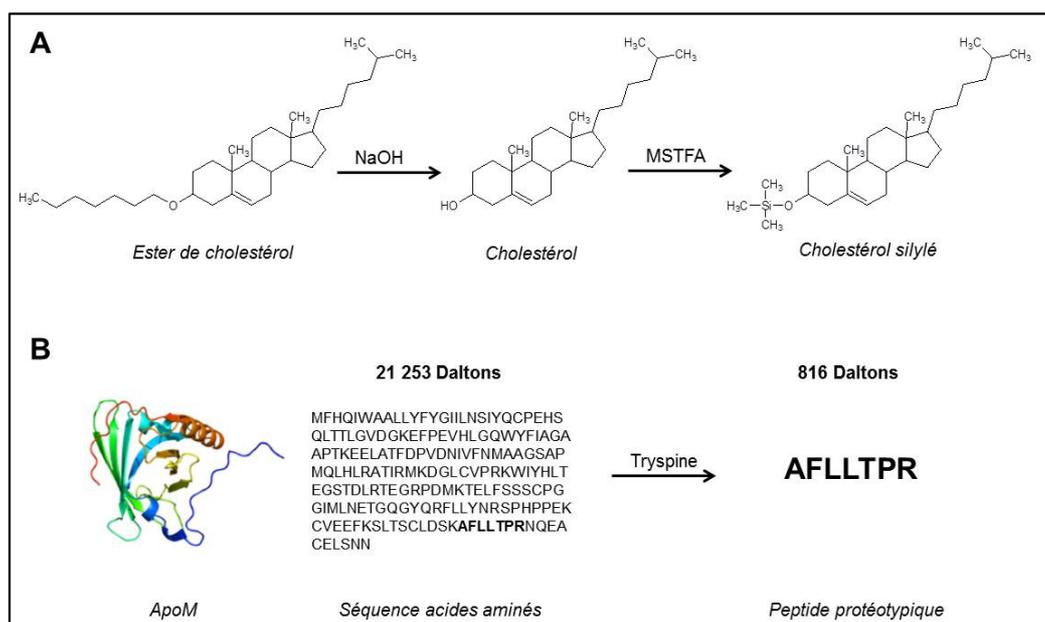
résiduels ainsi purifiés, ou l'immuno-capture qui consiste à fixer le ou les analytes d'intérêt de façon spécifique (Keshishian *et al.* 2009 ; Gauthier *et al.* 2015). Cette technique peut aussi être utilisée en ligne sur des équipements chromatographiques (colonne d'affinité).



**Figure 3 :** Quelques exemples de méthodes de préparation des échantillons biologiques (adapté d'Humbert 2010)

**Modification chimique des analytes** – Avant l'analyse, il est parfois nécessaire de modifier chimiquement les composés d'intérêt afin de leur conférer des propriétés physico-chimiques optimales pour la méthode analytique employée. Les analytes peuvent ainsi être dérivés à l'aide d'un groupement chimique fonctionnel (**Figure 4**). Ces réactions doivent être le plus spécifique possible et à hauts rendements. En effet, l'intérêt principal est de transformer les analytes en composés stables, spécifiquement isolables par chromatographie, ionisables pour la détection par spectrométrie de masse et caractérisables lors des analyses par spectrométrie de masse en tandem (Sternson 1987 ; Santa *et al.* 2007 ; Croyal *et al.* 2010). Il existe aujourd'hui un très large panel de réactifs susceptibles d'interagir avec de nombreuses fonctions chimiques telles que les amines, les cétones, les acides carboxyliques... Dans certains cas, le problème est inversé et il est nécessaire de réduire la taille des composés avant analyse. C'est le cas par exemple des esters de cholestérol où l'hydrolyse basique de l'ester par saponification est un prérequis pour l'étape de dérivation (**Figure 4**), elle-même

nécessaire pour rendre le composé volatil et donc analysable par chromatographie en phase gazeuse. Les macromolécules telles que les protéines peuvent également montrer des difficultés lors de l'analyse, notamment en spectrométrie de masse en tandem. Les protéines peuvent ainsi être réduites en peptides sous l'action d'enzymes spécifiques (protéases) ou de certains réactifs chimiques (Percy *et al.* 2014) (**Figure 4**). Ces modifications chimiques sont généralement réalisées après extraction des composés des matrices biologiques, mais peuvent, dans certains cas, être effectuées directement sur l'échantillon afin d'améliorer l'extraction des analytes.



**Figure 4 :** Exemple d'hydrolyse et de dérivation pour le cholestérol estérifié (A) et de protéolyse enzymatique pour une protéine (B)

**Concentration des analytes** – Outre le fait de se mettre dans des conditions optimales d'analyse, les étapes d'extraction et de dérivation ont pour intérêt de permettre la concentration des analytes. Ceci entraîne une meilleure sensibilité analytique et permet de se rapprocher le plus possible des sensibilités physiologiques requises. En effet, après extraction et/ou dérivation, il est courant de retrouver les analytes dans un solvant non compatible avec l'outil analytique désiré. Ce solvant peut être éliminé par différentes techniques telles que le séchage sous flux de diazote ( $\text{N}_2$ ), l'évaporation sous vide ou à pression atmosphérique ainsi que la lyophilisation. Les échantillons séchés sont alors repris dans un solvant adéquat. Il est dès lors possible d'utiliser un volume de reprise inférieur au volume initial de la prise d'essai afin de concentrer l'échantillon et gagner en sensibilité. A noter que le choix du solvant de reprise est primordial et peut impacter fortement la fiabilité de l'analyse. Il doit à la fois

permettre une excellente solubilisation des composés à analyser (dérivés ou non) sans interagir avec le système d'analyse (interactions chromatographiques, suppression du signal...).

**Efficacité et suivi des méthodes de préparation** – La pertinence des étapes pré-analytiques découle de leur rendement. L'ensemble des étapes de préparation de l'échantillon biologique peut être catalysé par différents paramètres comme la température et le pH suivant le type des analytes. Néanmoins, ces différentes étapes de préparation amènent à manipuler les échantillons à plusieurs reprises, ce qui peut induire des biais analytiques. Afin de corriger les éventuelles erreurs expérimentales et de suivre le bon déroulement des étapes préparatoires, l'ajout d'un ou de plusieurs standard(s) interne(s) est nécessaire. Un standard interne est un composé exogène ayant des propriétés physico-chimiques très proches voire identiques à celles de l'analyte. Le standard interne est ajouté de façon équivalente à tous les échantillons et le plus précocement possible. Sa détection par le système analytique doit être spécifique et non interférente avec celle de l'analyte (Sargent 2013). Le signal obtenu pour le standard interne servira à normaliser celui obtenu pour l'analyte (Liu *et al.* 2013 ; Ferchaud-Roucher *et al.* 2013 ; Percy *et al.* 2014). En spectrométrie de masse, les standards internes les plus courants sont les analytes enrichis en isotopes stables ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). Des composés exogènes faisant consensus pour une famille d'analytes donnée peuvent également être employés (Croyal *et al.* 2010 ; Mi *et al.* 2016).

### 1.2.2. Couplage aux méthodes séparatives

Après extraction de la matrice biologique, les analytes peuvent être introduits dans le système analytique. Cette étape peut se faire par infusion directe ou par couplage avec une technique séparative. L'introduction directe, bien que rapide et facile, présente de sérieuses limites et empêche toute quantification. Elle peut également être utilisée pour le paramétrage des systèmes lors d'analyses ciblées. Dès lors, les techniques séparatives sont très largement utilisées pour les analyses biochimiques par spectrométrie de masse. Elles assurent une dernière élimination des interférences et une séparation des composés extraits ensemble lors de la préparation de l'échantillon, en vue d'accroître la spécificité de la détection par spectrométrie de masse.

**Principe de la chromatographie** – La chromatographie est une méthode physico-chimique permettant la séparation de différentes substances présentes dans un mélange

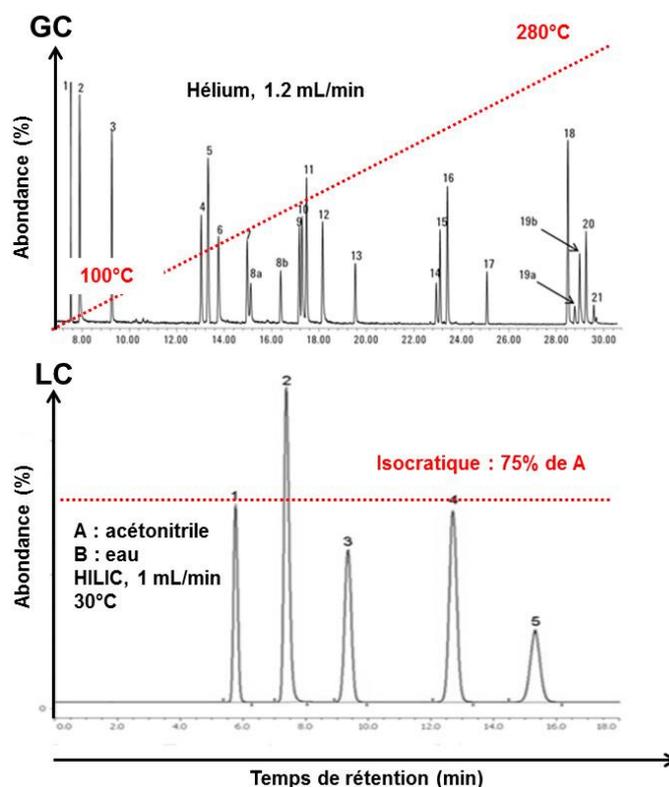
homogène. Son principe réside sur la séparation des analytes en fonction de leur affinité avec deux phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. La chromatographie peut être analytique et couplée à un détecteur en vue d'établir une quantification, ou préparative (semi-préparative) afin de purifier un échantillon complexe (ex : FPLC). A l'injection, les composés présents dans le mélange sont fixés sur la phase stationnaire, puis élués séquentiellement au cours du temps (temps de rétention) par la phase mobile la traversant. La chromatographie peut être réalisée sur une surface plane (couche mince) ou sur une colonne. Différents types de chromatographie existent et sont classés en fonction du type de phase mobile. On distingue ainsi la chromatographie en phase gazeuse (GC, *gas chromatography*), la chromatographie en phase liquide (LC, *liquid chromatography*) ultra ou haute performance (UPLC ou HPLC, *ultra/high performance liquid chromatography*) et la chromatographie de convergence (UPC<sup>2</sup>, Waters, *ultra performance convergence chromatography*) aussi appelée chromatographie en phase supercritique (SFC, *supercritical fluid chromatography*). Différents types d'interactions entre la phase stationnaire et les analytes existent comme la chromatographie d'affinité, de partage, à échange d'ions, chirale et d'exclusion stérique. Les couplages à la spectrométrie de masse les plus courants sont la GC, l'HPLC et l'UPLC. L'électrophorèse capillaire, autre technique séparative utilisée en biochimie pour isoler les protéines et les acides nucléiques, peut également être couplée à la spectrométrie de masse (Garcia *et al.* 2017). Il en est de même pour la SFC ou l'UPC<sup>2</sup> (Waters) (Zhou *et al.* 2014).

**La chromatographie en phase gazeuse** – La GC couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a pour avantage d'offrir une excellente résolution chromatographique très reproductible (**Figure 5**). En outre, elle permet de quantifier les analytes spécifiquement avec une bonne sensibilité. Les phases stationnaires sont majoritairement des colonnes capillaires, pouvant faire jusqu'à 50 mètres de long (bobine), traversées par un gaz vecteur inerte (phase mobile : Hélium, Argon...) entraînant les analytes. L'échantillon est injecté dans le système où il est vaporisé. Les analytes, à l'état gazeux, sont ainsi entraînés par le gaz vecteur et leur séparation se fait majoritairement en fonction du débit appliqué à ce gaz, de la température appliquée à la colonne et de son pouvoir de rétention. Ces paramètres peuvent être programmés de façon isocratique (constant au cours du temps), graduelle ou par plateaux suivant le niveau de séparation désiré. Le principal inconvénient de l'analyse par GC-MS est qu'elle requiert des analytes thermostables et volatiles. Il est donc souvent nécessaire d'effectuer une étape de dérivation notamment pour les composés polaires et peu volatiles (lipides).

**La chromatographie en phase liquide** – Les couplages LC et spectrométrie de masse (LC-MS) sont apparus tardivement en comparaison des couplages GC-MS en raison de la nécessité d'évaporer la phase mobile et les analytes avant leur entrée dans le spectromètre de masse. Pour les couplages LC-MS, les séparations se font essentiellement en mode phase inverse ou apparenté phase normale (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*) et sous haute voire très haute pression (HPLC, UPLC). En phase inverse, la phase stationnaire est constituée d'une colonne possédant des greffons hydrophobes alkyles contrairement au mode HILIC. En phase inverse, les composés sont élués du plus polaire au plus apolaire. Le mode HILIC est principalement utilisé dans le cas de composés très polaires difficilement retenus en phase inverse, ou dans le cas de composés très apolaires difficilement élués en phase inverse. Les colonnes sont de longueur (L) et de diamètre interne (D) variables (généralement,  $L < 30$  cm et  $D < 5$  mm) pour une taille de particules de 3-5  $\mu\text{m}$  en HPLC et inférieur à 2  $\mu\text{m}$  en UPLC. Lors de l'injection, les analytes se fixent à la phase stationnaire par différents types de liaisons (hydrogène, Van der Waals...). L'éluion se fait *via* le flux de la phase mobile constituée de plusieurs phases miscibles (souvent deux). La première phase, dite faible, n'a presque pas de pouvoir éluant contrairement à la seconde, dite forte. Le débit de la phase mobile (0,1-1,0 mL/min) et la température de la colonne (20-80°C) jouent sur la rétention des composés mais ne constituent pas les paramètres majeures. C'est la composition de la phase mobile par rapport au type de phase stationnaire qui permet l'éluion plus ou moins sélective des composés. Les phases mobiles peuvent évoluer en mode isocratique, en mode gradient ou par plateaux (mélange gradient et isocratique). Enfin, des additifs à effets tampons peuvent être ajoutés à la phase mobile afin d'améliorer la rétention des analytes sous condition qu'ils soient compatibles à la détection par spectrométrie de masse (Suu *et al.* 2015). Ces dernières années, l'évolution des systèmes HPLC vers les systèmes UPLC (ou UHPLC) a permis de gagner considérablement en temps d'analyse tout en améliorant la résolution des pics chromatographiques et la sensibilité des analyses. D'autres systèmes ont également vu le jour pour l'analyse spécifique des macromolécules (nano- et micro-LC, débit  $< 0,1$  mL/min).

**La chromatographie de convergence ou en phase supercritique** – La SFC est une forme de chromatographie en phase normale utilisée pour l'analyse et la purification de molécules thermiquement labiles de poids moléculaire faible à modéré, et pour la séparation des composés chiraux. Les principes sont semblables à ceux de l'HPLC et de l'UPLC, mais la SFC utilise principalement le dioxyde de carbone à l'état supercritique (31,1°C et 73,8 bars)

comme phase mobile. Par conséquent, le système doit être pressurisé. Comme la phase supercritique représente un état dans lequel convergent des propriétés de liquide et de gaz, la chromatographie par fluide supercritique est aussi appelée "chromatographie de convergence" (Pinkston *et al.* 2006).



**Figure 5 :** Exemples de chromatogrammes (Lynam 2016 ; Pandiscia 2016)

Au cours de leur élution séquentielle (**Figure 5**), les composés sont concentrés et dirigés vers le spectromètre de masse afin d'y être détectés. Les analytes doivent cependant être transformés au préalable en ions gazeux dans la chambre d'ionisation.

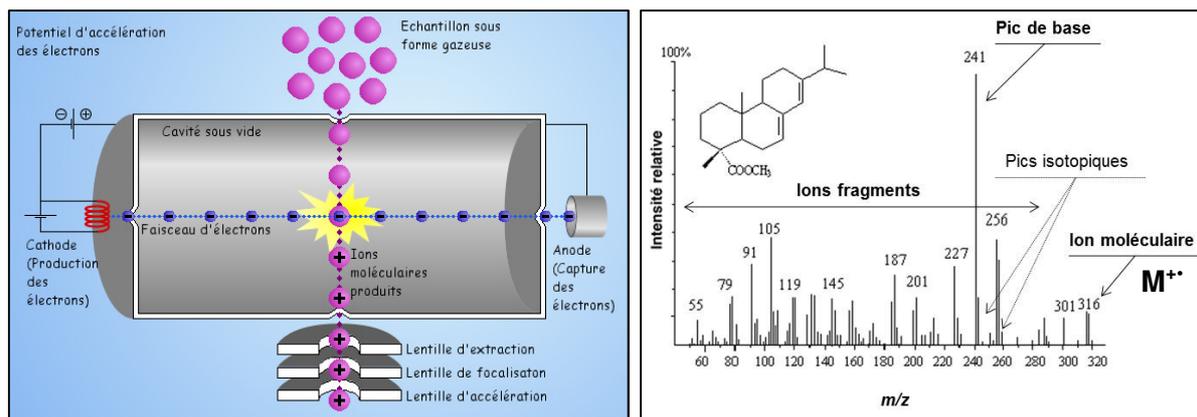
### 1.2.3. Les fours à combustion

La spectrométrie de masse sépare des ions, majoritairement issus d'espèces moléculaires, en fonction de leur rapport  $m/z$ . Cependant, l'analyse d'espèces élémentaires à échelle atomique est parfois nécessaire. Il est alors possible de brûler ou de pyrolyser les molécules organiques en utilisant un four à combustion ou à pyrolyse. Les éléments atomiques sont ensuite conduits sous forme gazeuse vers la source d'ionisation. Les fours à combustion sont majoritairement couplés à la GC (Stellaard & Lütjohann 2015) bien que des couplages à la LC existent (Federherr *et al.* 2016).

### 1.3. Les sources d'ions

La spectrométrie de masse sépare des ions en phase gazeuse selon leur rapport  $m/z$ . Pour analyser un échantillon, ce dernier doit donc être vaporisé avant l'ionisation. Jusqu'au début des années 1980, les molécules étaient ionisées par impact électronique (EI, *electron impact*) ou ionisation chimique (CI, *chemical ionization*). Les composés devaient être à l'état gazeux et donc préalablement vaporisés, ce qui reste aisé pour les petites molécules organiques volatiles introduites par GC. Cependant la plupart des molécules du vivant, polaires et thermiquement labiles, n'ont pas ces propriétés et doivent être préalablement dérivées (Griffiths *et al.* 2001). L'introduction des méthodes d'ionisation dites « douces » comme la désorption laser assistée par matrice (MALDI, *matrix-assisted laser-desorption-ionization*) (Karas & Hillenkamp 1988) et l'electrospray (ESI, *electrospray ionization*) (Yamashita, & Fenn 1984a ; Yamashita, & Fenn 1984b ; Fenn *et al.* 1989) a permis l'analyse directe de biomolécules polaires et thermolabiles sans dérivation préalable. En outre, la gamme d'analyse en terme de poids moléculaires, jusqu'alors limitée, a été considérablement augmentée (Rostom, & Robinson 1999 ; Tito *et al.* 2000). Ces nouvelles sources d'ions ont ainsi permis de vaporiser des échantillons non gazeux rendant possible les couplages à l'électrophorèse capillaire et à la LC.

**Couplage à la chromatographie en phase gazeuse** – L'EI fonctionne sous vide et est principalement employée en couplage avec la GC. Les molécules arrivent à la source d'ionisation à l'état gazeux où elles rencontrent un faisceau d'électrons produit par un filament. Lors de cette rencontre, un électron est arraché à la molécule de masse moléculaire  $M$ , conduisant à la formation d'un radical cation de type  $M^+$  (Figure 3). Cette technique d'ionisation hautement énergétique induit une fragmentation importante de l'ion moléculaire de telle sorte qu'il n'est pas toujours observé. L'EI conduit ainsi à l'enregistrement d'un spectre de masse présentant de nombreux fragments et donc très riche en informations structurales (Bleakney 1929 ; Nier *et al.* 1947 ; Werner 2011). Une alternative à l'impact électronique lors des couplages à la GC est la CI (Harrison *et al.* 1983). Cette méthode utilise un gaz réactif (ammoniac, méthane...) qui est ionisé par un faisceau d'électrons. Des ions de la substance à analyser se formeront par réactions chimiques avec les ions produits du gaz réactif. Il s'agit d'une méthode d'ionisation douce, conduisant à une faible fragmentation de la molécule d'intérêt qui sera détectée sous sa forme protonée en mode positif ( $[M+H]^+$ ) ou déprotonée en mode négatif ( $[M-H]^-$ ).



**Figure 6** : Schéma d'une source d'ions à impact électronique et exemple de spectre de masse généré (images internet)

**Couplage à la chromatographie en phase liquide** – L'ESI est l'une des techniques les plus utilisées pour les couplages LC-MS. C'est une technique d'ionisation douce fonctionnant à pression atmosphérique et permettant une faible fragmentation des ions. L'ESI fonctionne en modes positif et négatif et permet la formation d'ions multichargés majoritairement de types  $[M+nH]^{n+}$  ou  $[M-nH]^{n-}$  mais d'autres adduits sont possible ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $HCO_2^-$ ...). L'ESI transforme le composé élué dans la phase liquide en ion gazeux, en pulvérisant la solution à travers un capillaire chauffé. Un courant de gaz sec ( $N_2$ ) est ensuite dirigé dans le spray qui est soumis à une différence de potentiel de quelques kV. Des gouttelettes chargées sont alors produites, et celles-ci se réduisent au fur et à mesure de l'évaporation du solvant sous l'effet du gaz sec. L'excès de charges électriques dans chaque gouttelette, combiné à l'évaporation progressive du solvant, conduit à la formation d'un cône dynamique à l'extrémité du capillaire, appelé « cône de Taylor ». Lorsque la charge de la solution qui forme le cône de Taylor s'approche de la limite de Rayleigh, les répulsions coulombiennes excèdent les forces de cohésion des gouttelettes. Ce phénomène induit une cascade d'explosions coulombiennes au cours de laquelle des microgouttelettes sont formées, permettant ainsi la désorption de molécules monochargées et multichargées pour l'analyse des macromolécules (Griffiths *et al.* 2001) (Figure 7). Dans le cas de petits composés (< 1500 Daltons) moins polaires et plus difficilement ionisables, deux autres sources d'ions peuvent être utilisées en couplage LC-MS : l'APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) et l'APPI (*atmospheric pressure photo ionization*). Tout comme la CI, l'APCI fait appel à des réactions ions-molécules, où les ions primaires proviennent du solvant ionisé par une décharge Corona (Byrdwell 2001). Dans le cas de l'APPI, les analytes vaporisés sont ionisés par des réactions chimiques induites par des photons souvent catalysés par l'utilisation de solvants dopants

(toluène, acétone) (Raffaelli & Saba 2003). Ces deux sources produisent des ions de types  $[M+H]^+$  en mode positif et  $[M-H]^-$  en mode négatif. En mode positif, l'APPI produit également des ions du type  $M^+$ .

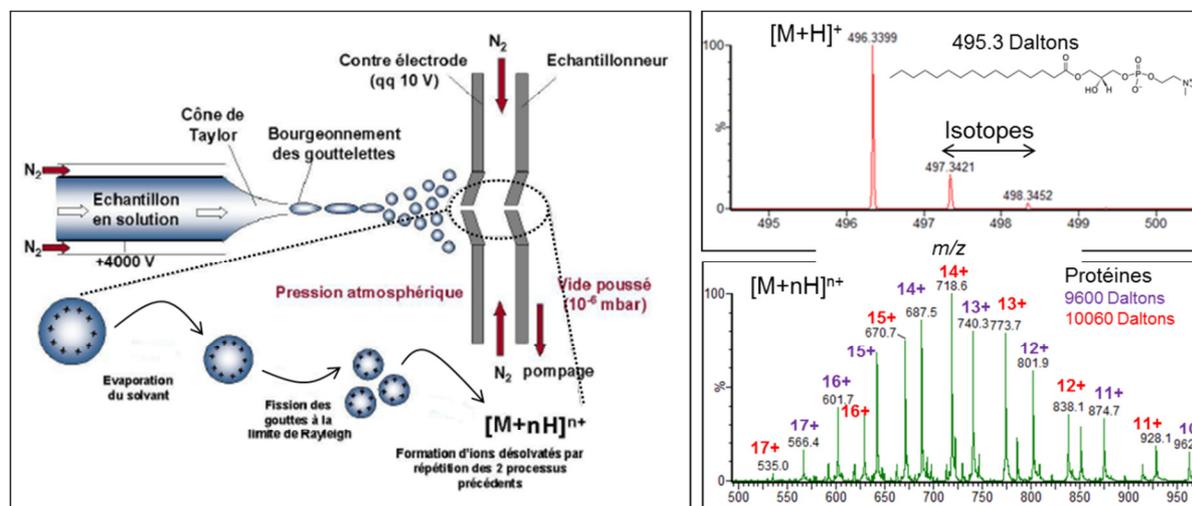


Figure 7 : Schéma d'une source électrospray (Werner 2011) et exemples de spectres de masse

**Autres méthodes d'ionisation** – Plusieurs autres types de sources d'ionisation, principalement basées sur la désorption d'un échantillon solide ou co-cristallisé, existent. On distingue ainsi les techniques MALDI, SALDI (*surface-activated laser desorption ionisation*) et DIOS (*desorption/ionisation on silicon*) fonctionnant sous vide. Ces techniques ont été développées afin d'analyser les molécules de haut poids moléculaire et conduisent à la formation d'ions monochargés et multichargés de type  $[M+nH]^{n+}$ , avec une nette prépondérance pour les monochargés. Ces méthodes sont peu sensibles en mode négatif (Guinan *et al.* 2015). Les sources de type DESI (*desorption-electrospray ionisation*), à pression atmosphérique, et SIMS (*secondary ion mass spectrometry*), son analogue sous vide, sont également utilisées pour certaines applications bien précises telles que l'imagerie par spectrométrie de masse (Morelato *et al.* 2013 ; Kraft & Klitzing 2014). Notons aussi la technique FAB (*fast atom bombardment*) qui a été la première à permettre l'analyse sous vide de macromolécules non vaporisables en solution (Griffiths *et al.* 2001). Enfin, d'autres techniques sont également utilisées pour l'ionisation de composés inorganiques comme l'ionisation par plasma (ICP ou *inductively coupled plasma*).

Les analytes ainsi transformés en ions gazeux vont pouvoir être séparés en fonction de leur rapport  $m/z$  dans l'analyseur en masse.

## 1.4. Les analyseurs en masse

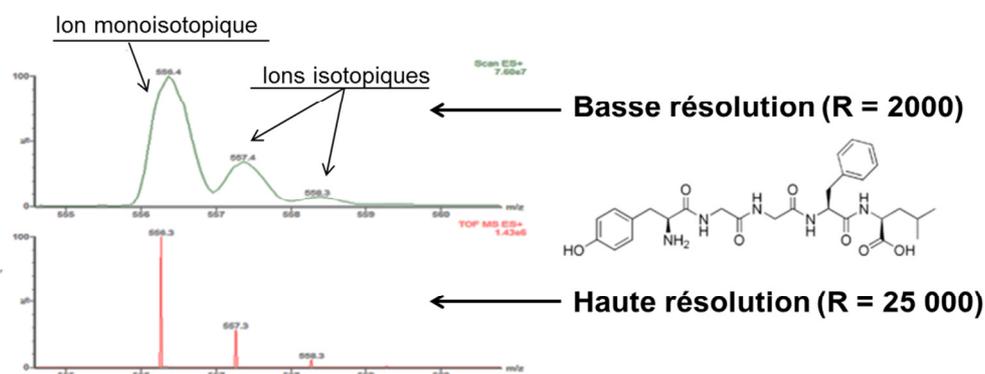
Il existe aujourd'hui une très grande variété d'analyseurs en masse dont les performances peuvent être définies en fonction des critères suivants (**Tableau 1**) :

- La vitesse de balayage, c'est-à-dire le temps pour établir un spectre pour une gamme de rapports  $m/z$ .
- La résolution (**Figure 8**), c'est-à-dire la capacité à séparer deux composés de rapports  $m/z$  proches. Cette donnée permet d'anticiper la précision de l'appareil utilisé.
- La précision ou la capacité du système à donner un rapport  $m/z$  proche de la valeur théorique. La précision est donnée en ppm (partie par million) et correspond à l'écart entre le rapport  $m/z$  expérimental et  $m/z$  théorique en fonction du rapport  $m/z$  théorique (ex : 1 ppm équivaut à un écart de 0,001 Th pour un rapport  $m/z$  de 1000 Th).

**Tableau 1** : Caractéristiques principales des principaux analyseurs en masse

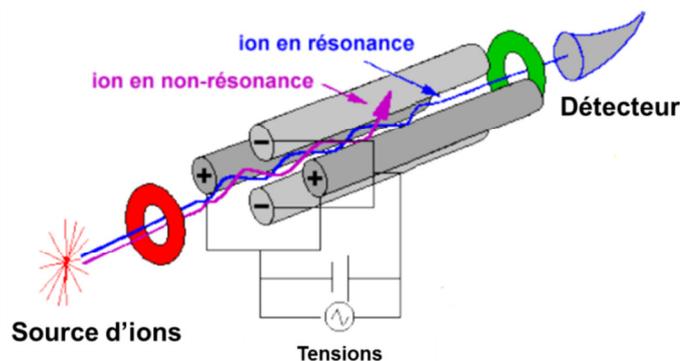
Analyseur	Résolution <sup>a</sup>	Précision (ppm)	Précision (Th)
Quadripôle	2 000	500	0,5
Piège à ions	5 000	200	0,2
Temps de Vol	10 000-30 000	1-10 <sup>b</sup>	0,001-0,01 <sup>b</sup>
Orbitrap <sup>®</sup>	Jusqu'à 100 000	< 3	< 0,003
Résonance cyclotronique	Jusqu'à 10 000 000 <sup>c</sup>	< 1	< 0,001

<sup>a</sup> FWHM : *Full width at half-maximum peak height*,  $R = m/\Delta m$  ou  $m$  est la mesure  $m/z$  et  $\Delta m$  la largeur du pic à 50% de sa hauteur maximale. <sup>b</sup> Si calibrant interne ; <sup>c</sup> Suivant la puissance du champ magnétique.



**Figure 8** : Spectres de masse obtenus pour la Leucine Enkephaline à basse et haute résolutions

**Le quadripôle (Q)** – Le quadripôle est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique. Les électrodes opposées sont reliées entre elles et soumises au même potentiel alors que les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels de même valeur, mais opposés (**Figure 9**). Les ions provenant de la source sont soumis à une tension continue et à une tension alternative, toutes deux appliquées entre ces quatre électrodes. Le trajet des ions dans le quadripôle est oscillant. Si l'amplitude des oscillations est trop grande, les ions ne seront pas détectés. Les tensions sont donc réglées de telle sorte que seul un ion de rapport  $m/z$  choisi puisse atteindre le détecteur (trajectoire stable). Bien que peu résolutif, le quadripôle a pour principal avantage de pouvoir être utilisé comme un filtre à ions. En outre, sa vitesse de balayage et son adaptabilité à différentes interfaces le rendent excellent pour les couplages aux chromatographies gazeuse et liquide et très efficace pour la spectrométrie de masse en tandem ([Campana 1980](#)). Sa gamme dynamique, c'est-à-dire la linéarité entre la concentration en analytes et la réponse du détecteur, est excellente et le rend pleinement adapté aux analyses quantitatives ciblées. L'analyseur octopolaire (8 électrodes) est identique à l'analyseur quadripolaire mais sert uniquement à la focalisation des ions.



**Figure 9** : Principe du quadripôle ([Dubreuil](#))

**Le piège à ions quadripolaire (IT)** – Ce système est constitué de trois électrodes à section hyperbolique. L'analyse et la détection des ions s'effectuent dans un même espace suivant des séquences temporelles successives. Les ions décrivent des mouvements oscillatoires stables au centre du piège. Par application d'une rampe de radiofréquences au niveau de l'électrode annulaire, les ions vont avoir une trajectoire déstabilisée et vont être éjectés du piège en fonction de leurs  $m/z$  croissants permettant ainsi l'acquisition d'un spectre de masse. Le piège à ions (IT, *ion trap*) est peu résolutif et sa gamme dynamique est moins bonne que celle du quadripôle. Il est cependant facilement adaptable aux couplages à la chromatographie gazeuse et liquide. Son principal intérêt réside dans sa capacité à produire

des fragmentations séquentielles ( $MS^n$ ), c'est-à-dire de réaliser des séquences MS/MS temporelles au lieu de les faire dans l'espace avec plusieurs analyseurs en tandem (voir section sur la spectrométrie de masse en tandem). Il est en effet possible de piéger des ions ayant un rapport  $m/z$  donné qui se fragmenteront au cours du temps dans le piège. Les ions produits seront ensuite éjectés comme décrit précédemment (Campana 1980).

**Le Temps de Vol (TOF)** – L'analyseur à temps de vol (TOF, *time of flight*) consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée. Son principe réside sur le fait que les ions de masses différentes se déplacent à des vitesses différentes, les plus petits étant les plus rapides. Le rapport  $m/z$  est donc directement mesurable à partir du temps de parcours de l'ion. Les systèmes TOF peuvent être linéaires ou équipés de réflectrons, permettant d'accroître la résolution des systèmes en séparant des ions de rapports  $m/z$  identiques mais d'énergies différentes (Figure 10). Les systèmes TOF peuvent également être couplés aux chromatographies gazeuse et liquide. En mode réflectron et avec l'utilisation de calibrants internes, ces systèmes présentent une précision de mesure tout à fait acceptable pour les analyses non-ciblées de type « omiques » et sont donc à même de caractériser des molécules en fonction de leur masse exacte. La gamme dynamique du TOF est relativement modérée, le rendant moins adapté que le quadripôle pour les analyses quantitatives (Boesl 2017).

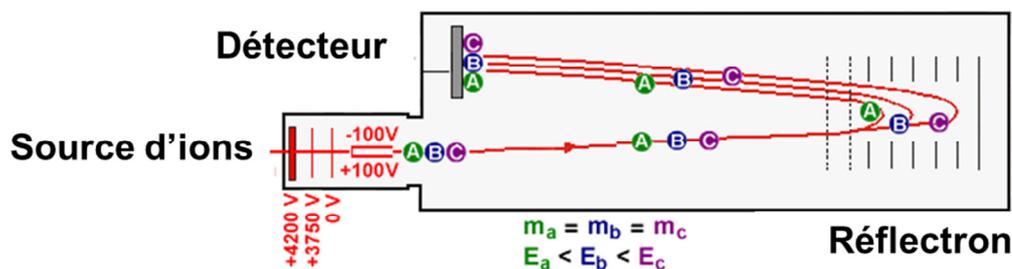


Figure 10 : Principe du temps de vol en mode réflectron (Dubreuil)

**L'analyseur à résonance cyclotronique (FT-ICR)** – L'analyseur à résonance cyclotronique d'ions (ICR) possède une cellule composée de six plaques sous tension, isolées les unes des autres. L'application d'un champ magnétostatique soumet les ions à un mouvement circulaire et uniforme (cyclotronique), et l'application d'un champ électrostatique permet de les piéger dans la cellule. Les ions sont ensuite excités par un champ alternatif à leur fréquence cyclotron afin d'être accélérés et mis en phase. Le courant induit par le mouvement des ions de même rapport  $m/z$  sera mesuré sur les plaques de détection sous forme

de sinusoïde. La fréquence cyclotron étant proportionnelle à  $1/(m/z)$ , l'inverse de la transformée de Fourier (FT) du courant obtenu permet d'aboutir au spectre de masse en  $m/z$ . Le FT-ICR, malgré une gamme dynamique assez restreinte, se caractérise par son excellente résolution permettant de lever toute ambiguïté lors de l'identification d'un composé. Le FT-ICR permet également l'analyse MS/MS dans la cellule même (Nikolaev *et al.* 2016).

**L'analyseur à secteur magnétique** – L'ion est éjecté dans un milieu où règne un champ magnétique uniforme et perpendiculaire au plan de la trajectoire. Du fait de la force de Lorentz, la trajectoire se courbe, et le point d'impact de l'ion permet de connaître son rapport  $m/z$  (Figure 11). L'analyseur à secteur magnétique est l'un des premiers analyseurs utilisés pour la spectrométrie de masse. Plusieurs géométries existent comme la simple et la double focalisation où un champ électrostatique est ajouté afin d'améliorer la résolution. Ces analyseurs ont largement été utilisés jusqu'au début des années 1990. Ils sont majoritairement couplés à la chromatographie gazeuse avec l'EI comme source d'ionisation. La spectrométrie de masse à rapport isotopique (IRMS, *Isotopic ratio mass spectrometry*) permet d'analyser un rapport d'isotopes stables ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) dans un échantillon donné. Les composés peuvent être séparés en amont par chromatographie. Ils sont ensuite oxydés ou brûlés dans un four à combustion, les convertissant en gaz simple tel que le  $\text{CO}_2$ . Pour le  $\text{CO}_2$ , l'IRMS s'intéressera ensuite aux rapports  $m/z$  44, 45 et 46 qui correspondent aux combinaisons isotopiques des ions produits par ce gaz. Il sera donc possible de déterminer les rapports isotopiques des isotopes  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  et  $^{18}\text{O}$  dans différentes combinaisons et proportions. Les signaux sont ensuite traités mathématiquement pour afficher les différents rapports analysés (Stellaard & Lütjohann 2015).

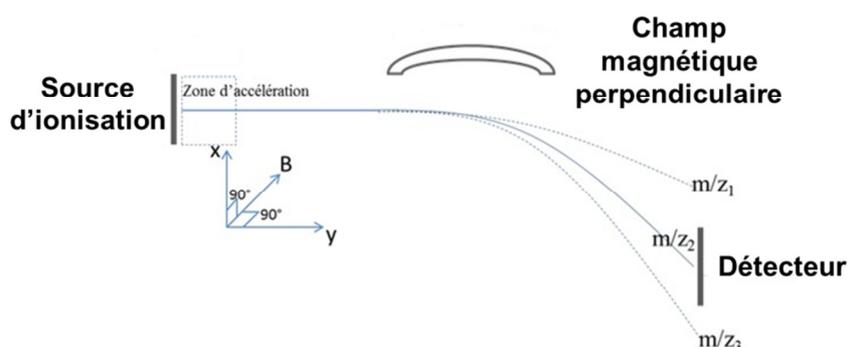


Figure 11 : Principe du secteur magnétique à simple focalisation (www.masse-spec.fr)

**L'Orbitrap®** – L'Orbitrap® est un piège à ions, dans lequel les ions se mettent en orbite à une fréquence dépendante de leur rapport  $m/z$ . L'Orbitrap® se compose d'une électrode creuse

externe et d'une électrode coaxiale. Cette dernière est portée à une tension alternative de polarité opposée à celle des ions qui sont injectés tangentiellement à ce champ. Le mouvement des ions dans l'Orbitrap<sup>®</sup> adopte une trajectoire spirale autour de l'électrode centrale, décomposée en un mouvement circulaire et un mouvement axial, dont la fréquence est exploitée pour mesurer le rapport  $m/z$  par la transformation de Fourier. Le mouvement axial des ions génère un courant induit enregistré par le détecteur qui est placé sur les électrodes creuses. La précision des mesures de rapports  $m/z$  est particulièrement bonne et la résolution rivalise avec celle du FT-ICR. En outre, la gamme dynamique de l'Orbitrap<sup>®</sup> est satisfaisante. Il est principalement utilisé en spectrométrie de masse en tandem, en association à un piège à ions linéaire, et peut être couplé aux chromatographies gazeuse et liquide (Perry *et al.* 2008).

### 1.5. La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) consiste à combiner plusieurs analyseurs en masse. Un ion précurseur de rapport  $m/z$  est sélectionné dans le premier système. Cet ion est ensuite dirigé vers une cellule de collision où, sous l'influence d'un gaz inerte (Argon, Helium), son énergie interne sera augmentée par collision jusqu'à sa dissociation. Un second analyseur mesure les rapports  $m/z$  des fragments générés (Figure 12). La MS/MS peut être réalisée à l'aide de systèmes de différentes natures, mais également au sein d'un même analyseur dans le cas d'un piège à ions (Yates 1998). Le mode MS/MS est souvent utilisé pour les systèmes utilisant une source d'ionisation douce ne générant que très peu d'ions fragments lors de l'ionisation. Les principaux systèmes utilisés en MS/MS sont le triple quadripôle (QqQ), le piège à ions quadripolaire (IT) et les systèmes hybrides : Q-TOF, Q-IT, IT-TOF, IT-FT-ICR, IT-Orbitrap<sup>®</sup>

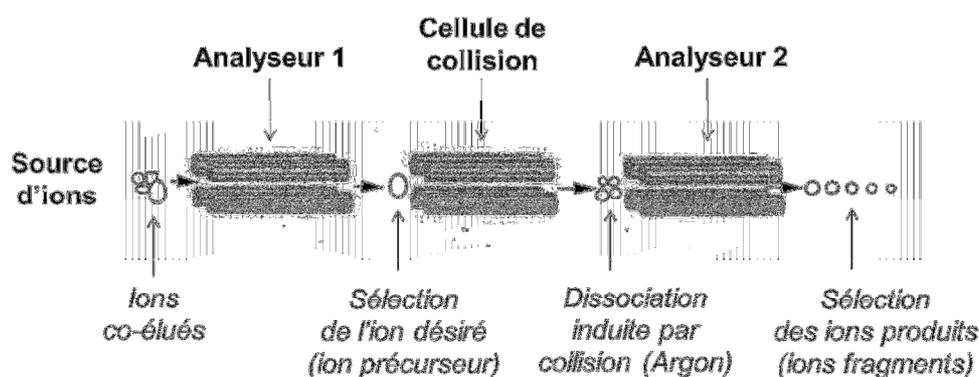


Figure 12 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem, cas du triple quadripôle (Yates 1998)

L'analyse MS/MS peut être menée selon quatre modes différents en fonction de l'information recherchée (Lam & Shui 2013).

- Le mode descendant : le premier analyseur sert à sélectionner l'ion d'intérêt selon son rapport  $m/z$  et le dirige vers la cellule de collision. Les fragments formés dans la cellule de collision sont séparés par le deuxième analyseur et analysés. Le spectre obtenu présente à la fois l'ion précurseur (minoritaire) et ses ions fragments. Ce mode est principalement utilisé pour l'identification structurale des composés. En effet, tout comme les fragments générés dans les sources d'ionisation dures (EI), les ions se fragmentent et se dissocient selon des règles de chimie gazeuse bien précises en fonction de leur structure (ex : réarrangements de type McLafferty, retro Diels-Alder...).
- Le mode ascendant : le premier analyseur balaie une gamme de masses définie tandis que le deuxième est focalisé sur un rapport  $m/z$  précis. Tous les ions générés dans la source et capables de donner un fragment de même rapport  $m/z$  seront donc ainsi détectés. Ce mode est principalement utilisé pour la quantification d'un ensemble de composés ayant des structures chimiques proches (ex : lipides à phosphocholine).
- Le mode perte de neutre : les deux analyseurs balaient une gamme de masses simultanément et avec un décalage de masse constant. Le spectre établi présentera alors tous les ions parents capables de se fragmenter en générant un fragment neutre de masse égale au décalage imposé. Comme le précédent, ce mode permet de rechercher des composés ayant des similitudes concernant leurs structures chimiques (ex : conjugués à l'acide glucuronique).
- Le mode MRM (*multiple reaction monitoring*) : l'ion parent est sélectionné par le premier analyseur et fragmenté dans la cellule de collision, comme en mode descendant. En revanche, le second analyseur est focalisé sur un ion produit. Ce mode est l'analogue du mode SIR ou SIM (*single ion reaction* ou *single ion monitoring*) souvent utilisé en MS simple mais présente une double sélectivité, au niveau de l'ion parent et de l'ion produit. En outre les deux analyseurs étant fixés à des tensions constantes, la sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage, faisant de la MRM un mode de choix pour la quantification.

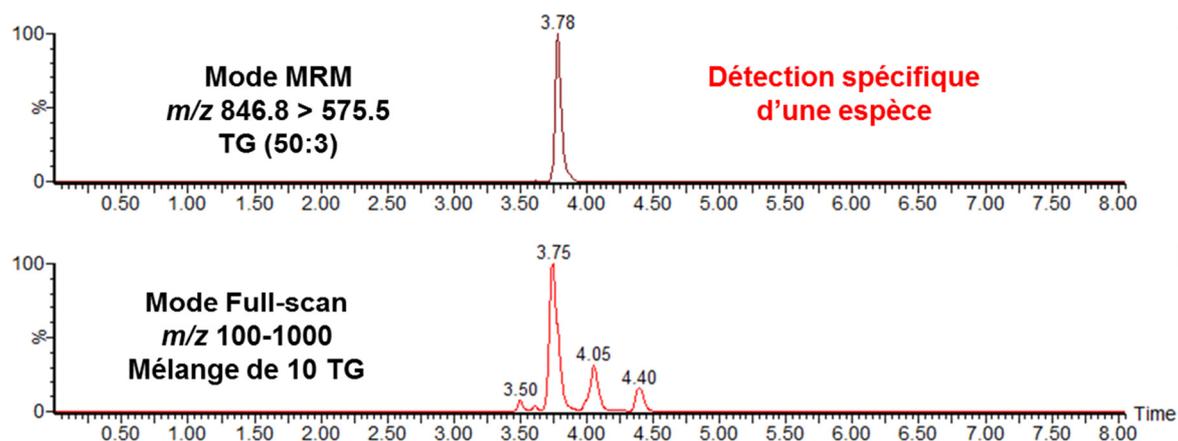
Le **Tableau 2** récapitule l'ensemble des modes de balayage disponibles sur des systèmes en tandem utilisés en mode MS ou MS/MS. A noter que les analyseurs à basse résolution (QqQ et Q-IT) sont extrêmement performants pour les analyses quantitatives lorsqu'ils sont utilisés en mode MRM. En effet, ce mode de détection très ciblé permet, de par sa double

sélectivité, de palier à la faible précision de mesure des rapports  $m/z$  (**Figure 13**). Ce mode permet également de descendre très bas en sensibilité (pmol/L) contrairement aux autres modes et aux analyseurs à haute résolution. Le mode descendant est, quant à lui, très utilisé sur les systèmes hybrides (Q-TOF, IT-TOF, IT-FT-ICR, IT-Orbitrap<sup>®</sup>) où le second analyseur à haute résolution permet de caractériser structuralement les composés avec précision. Dans le cas des systèmes hybrides, le premier analyseur à basse résolution est utilisé pour sa grande efficacité à filtrer les ions précurseurs. Tout comme en MS simple, les systèmes hybrides sont moins performants pour les analyses quantitatives en raison des gammes dynamiques plus ou moins limitées des seconds analyseurs.

**Tableau 2** : Résumé des modes de balayage utilisés en spectrométrie de masse (Lam & Shui 2013)

Mode	Analyseur 1	Cellule	Analyseur 2	Application
Full-scan	---	---	Balayage sur une gamme $m/z$	Analyse non-ciblée (meilleur si analyseur 2 à haute résolution)
SIR ou SIM	---	---	Fixé sur des valeurs $m/z$ définies	Analyse ciblée (surtout utilisé sur les systèmes MS simples)
PIS (descendant)	Fixé sur des valeurs $m/z$ définis	Activée	Balayage sur une gamme $m/z$	Analyse ciblée d'un groupe de composés (haute et basse résolution)
PreIS (ascendant)	Balayage sur une gamme $m/z$	Activée	Fixé sur des valeurs $m/z$ définies	Analyse ciblée d'un groupe de composés (haute et basse résolution)
NL (perte de neutre)	Balayage sur une gamme $m/z$	Activée	Balayage sur une gamme $m/z$ dont une valeur fixe a été soustraite par rapport à l'analyseur 1	Analyse ciblée d'un groupe de composés (haute et basse résolution)
MRM	Fixé sur des valeurs $m/z$ définis	Activée	Fixé sur des valeurs $m/z$ définis	Analyse ciblée très sensible
MS <sup>E</sup>	---	Oscillante	Balayage sur une gamme $m/z$	Analyse non-ciblée

SIR, *single ion monitoring*. SIM, *single ion reaction*. PIS, *product ion scan*. PreIS, *precursor ion scan*. NL, *neutral loss*. MRM, *multiple reaction monitoring*. MS<sup>E</sup>, *mass spectrometry energy*.

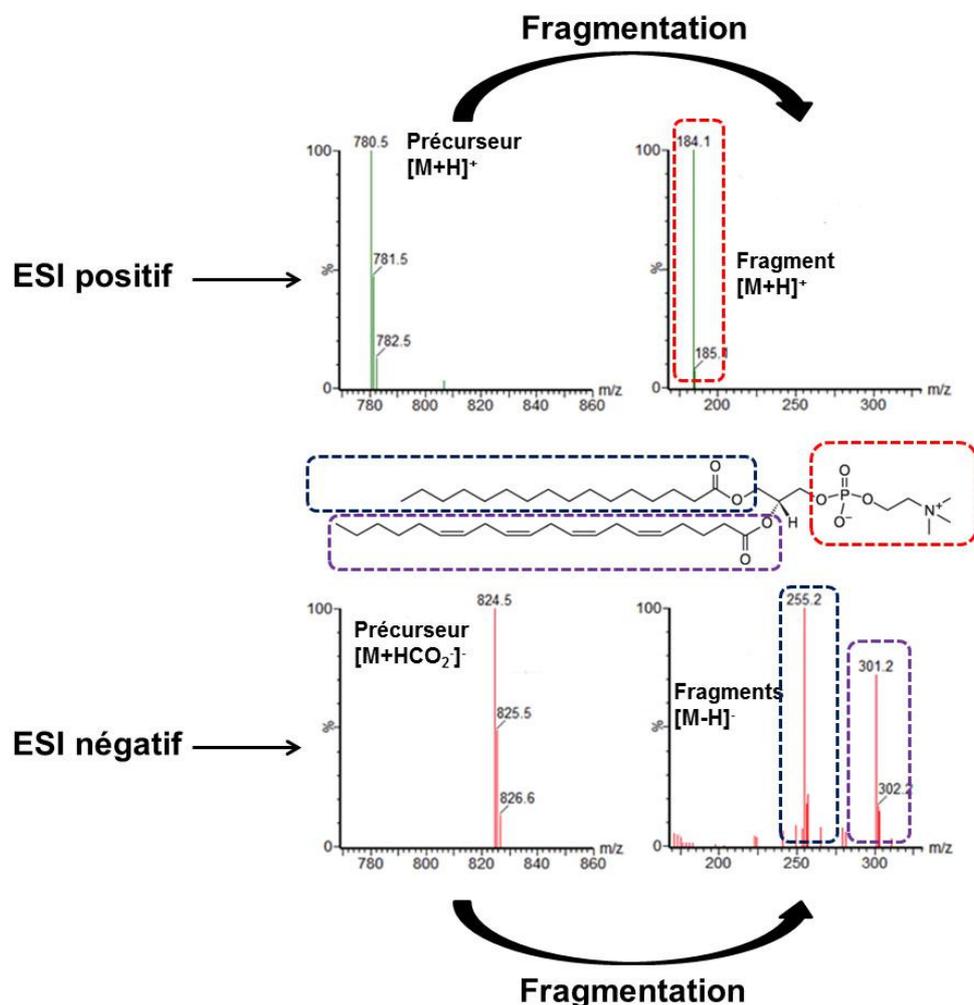


**Figure 13 :** Exemple de mode de balayage sur un mélange de 10 triglycérides (TG) séparés par UPLC et ionisés par ESI positif

Depuis peu, un nouveau mode de balayage a fait son apparition : le mode spectrométrie de masse à énergie ( $MS^E$  pour les systèmes Waters, **Tableau 2**). Ce mode fait osciller l'énergie dans la cellule de collision entre un niveau faible (voire nul) et un niveau élevé de façon très rapide. Le premier analyseur sert à guider les ions alors que le second détecte en parallèle les ions précurseurs (basse énergie) et les ions fragments (haute énergie). Le principal avantage de ce mode est d'obtenir en une seule injection les profils d'ions précurseurs et d'ions fragments. Ce mode est souvent utilisé lors des analyses non-ciblées, les profils obtenus à haute énergie servant de première approche à l'élucidation des structures. Son principal inconvénient est de ne pas filtrer les ions précurseurs avant la dissociation. Si deux composés ne sont pas séparés par chromatographie avant d'être introduits dans la source d'ionisation, alors le spectre de masse obtenu à haute énergie présentera les fragments de chacun des composés. L'utilisation de la mobilité ionique (IM) permet de compenser cet inconvénient. Elle consiste à soumettre des molécules ionisées à un champ électrique dans un courant de gaz. Les ions se déplacent dans le champ électrique à une vitesse qui dépendra de leur interaction avec le gaz, c'est-à-dire de leur masse, de leur taille et de leur forme : on parle de séparation suivant la mobilité. Cette méthode de séparation peut être utilisée avant et/ou après la dissociation. Néanmoins, l'addition de ce mode alourdi considérablement les analyses. De plus, cette méthode n'est réellement efficace qu'à des concentrations relativement élevées en analytes ([Paglia \*et al.\* 2015](#)).

Comme énoncé précédemment, les ions se fragmentent et se dissocient selon des règles de chimie gazeuse bien précises en fonction de leur structure. Certaines molécules sont en

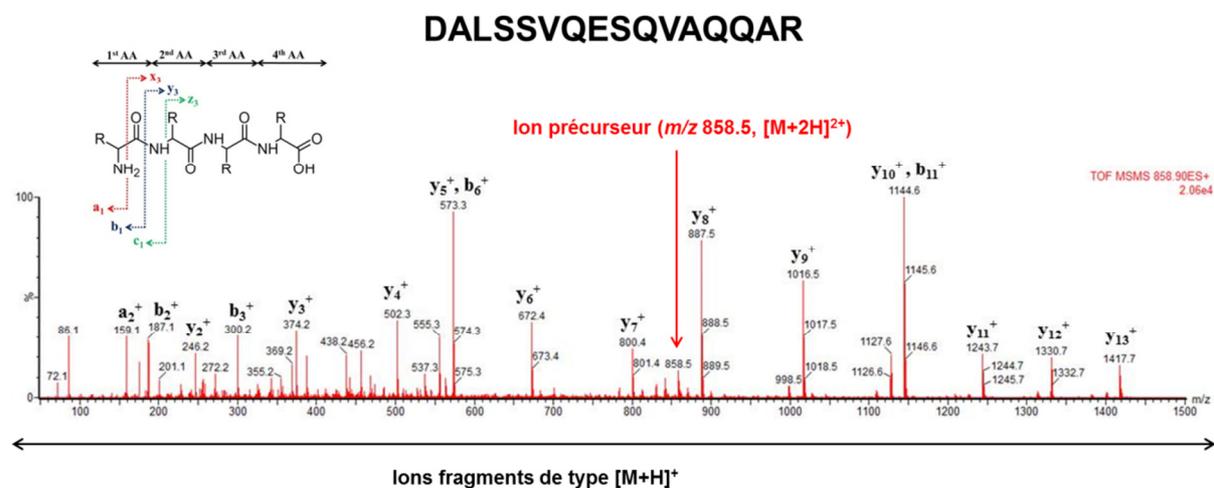
mesure de s'ioniser en mode positif et en mode négatif (*zwitterion*). Les fragments générés dans les deux modes étant différents, il est souvent nécessaire de réaliser les analyses MS/MS dans les deux polarités pour une caractérisation structurale plus précise (**Figure 14**).



**Figure 14 :** Elucidation structurale d'une phosphatidylcholine (glycérophospholipide) par MS/MS (ESI positif et négatif).

Enfin, la fragmentation des ions est généralement efficace pour les molécules de moins de 3000 Daltons. L'un des avantages de l'ionisation par ESI est la formation d'ions multichargés permettant l'analyse des macromolécules de hauts poids moléculaires. Cependant, il est à noter que les ions de type  $[M+nH]^{n+}$  produisent en majorité des ions fragments de type  $[M+(n-1)]^{(n-1)+}$  dont les valeurs des rapports  $m/z$  peuvent être plus élevées que celle de l'ion précurseur. Ce phénomène est à prendre en compte pour le séquençage des macromolécules comme les peptides (**Figure 15**) et justifie l'utilisation de la protéolyse enzymatique des protéines lors de la préparation des échantillons. En effet, cette hydrolyse permet de réduire

les protéines de grandes tailles en plusieurs peptides de tailles moyennes (Medzihradszky & Chalkley 2015).



**Figure 15 :** Elucidation structurale d'un peptide par MS/MS (ESI positif)

## 1.6. Les détecteurs

A l'instar des analyseurs en masse, il existe plusieurs types de détecteurs reposant sur des principes physiques différents. Cependant, leur rôle commun est de compter les ions, le plus souvent en convertissant un courant ionique (ions isolés par l'analyseur en masse) en courant électrique. Cette transformation du signal permet de représenter les données sous forme de spectres de masse par informatique. On distingue ainsi les détecteurs suivants :

- Les plaques photographiques (le premier système) très peu sensibles.
- Le cylindre de Faraday, précis mais peu sensible et lent. Il amplifie le signal ionique par transfert de charge de l'ion sur une surface conductrice.
- Le multiplicateur d'électrons, le plus courant, sensible mais moins précis que le cylindre de Faraday et à durée de vie limitée. Le signal est amplifié par la formation d'électrons secondaires.
- Le multiplicateur de photons, dérivé du multiplicateur d'électrons en moins rapide. Le signal est amplifié par la formation d'électrons secondaires, accélérés vers un écran phosphorescent où ils sont convertis en photons.

## 1.7. Conclusion

De par la grande diversité des technologies existantes, un grand nombre de combinaisons instrumentales est possible pour un laboratoire de recherche. La plateforme de Spectrométrie de Masse du Centre de Recherche en Nutrition Humaine de l'Ouest (PSM-CRNHO) est dotée de différents systèmes recouvrant une large gamme d'analyses possibles :

- 1 ultracentrifugeuse
- 1 système HPLC-UV
- 3 systèmes GC-EI/CI-MS (Q)
- 1 système GC-C-EI-IRMS (Secteur magnétique)
- 1 système UPLC/UPC<sup>2</sup>-ESI-MS/MS (QqQ)
- 1 système UPLC-ESI-IM-HRMS (Q-TOF)

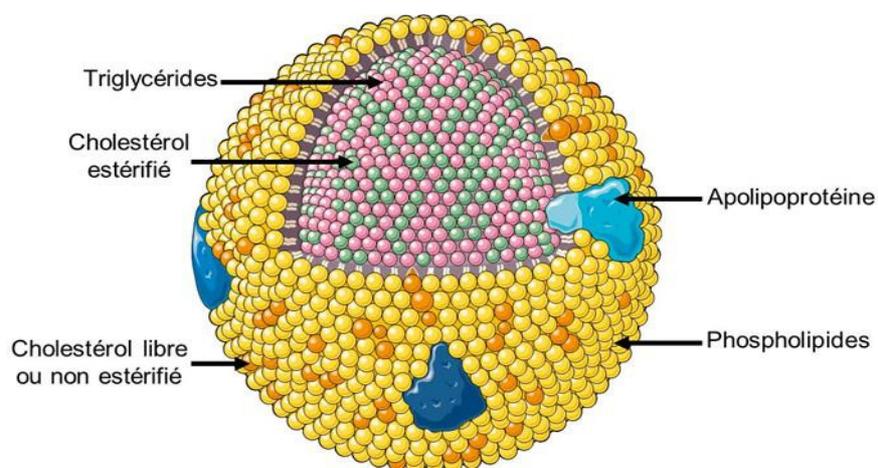
Pour les travaux présentés ici, nous avons principalement utilisé le système UPLC/UPC<sup>2</sup>-ESI-MS/MS dans sa configuration UPLC-ESI-MS/MS (ionisation positive principalement, mode MRM). De par sa grande sensibilité et sa rapidité, cet appareillage nous a permis de réaliser un grand nombre d'analyses ciblées, tant quantitatives que cinétiques, sur un panel de molécules présentant des propriétés très variées. En complément, pour les analyses non-ciblées, nous avons régulièrement intégré le système haute résolution UPLC-ESI-HRMS à nos analyses (modes HRMS, MS/MS et MS<sup>E</sup>), sans l'option mobilité ionique (IM). Cet outil très puissant sur la mesure des rapports  $m/z$  nous a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs lipidiques que nous avons pu ensuite suivre de façon ciblée sur le système cité précédemment. Enfin, de façon plus marginale, nous avons utilisé les systèmes GC-EI-MS (mode SIM) et GC-C-EI-IRMS (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) pour quelques mesures cinétiques bien particulières.

La spectrométrie de masse demeure aujourd'hui la méthode la plus sensible pour l'analyse quantitative et cinétique, ciblée et non-ciblée, d'échantillons biologiques. Néanmoins, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) constitue une technique complémentaire très couramment utilisée au sein des plateformes de métabolomique. La spectrométrie de masse est beaucoup plus sensible que la RMN, mais souffre d'une plus faible reproductibilité. En revanche, la RMN donne accès à des informations structurales uniques et est hautement reproductible lorsqu'elle est utilisée de façon appropriée. Par conséquent, la RMN et la spectrométrie de masse restent totalement complémentaires bien que cette technique n'ait pas été utilisée durant ces travaux (Marchand *et al.* 2017).

## 2. LES CONSTITUANTS DES LIPOPROTÉINES

### 2.1. Généralités sur les lipoprotéines

Les lipides représentent un grand ensemble de composés chimiques hétérogènes ayant pour propriété commune leur hydrophobicité, les rendant insolubles dans les milieux biologiques aqueux tels que le plasma, la lymphe ou le liquide interstitiel. Afin d'être véhiculés de leurs sites de production et d'absorption vers les sites de stockage, d'utilisation et d'élimination *via* ces milieux aqueux extracellulaires, les lipides vont se complexer avec des entités protéiques, ou apolipoprotéines, pour former des édifices macromoléculaires complexes mais hydrophiles : les lipoprotéines. De manière générale et schématique, les lipoprotéines présentent une structure sphérique pseudo micellaire. Le noyau central est composé de lipides apolaires et très hydrophobes, comme les triglycérides (TG) et le cholestérol sous ses formes estérifiées (CE), tandis que la surface constitue une enveloppe hydrophile composée d'apolipoprotéines et de lipides polaires, tels que les phospholipides (PL) et le cholestérol libre ou non estérifié (CL) (**Figure 16**) (Brewer 1981).



**Figure 16** : Représentation schématique d'une lipoprotéine (image Servier)

La cohésion moléculaire des lipoprotéines est assurée par des liaisons ioniques entre les fonctions polaires des PL et les fonctions amines et carboxyliques des acides aminés des apolipoprotéines, ainsi que par des liaisons de type van der Waals entre la partie hydrophobe des lipides et la chaîne aliphatique des acides aminés. Les lipoprotéines peuvent être classées en fonction de leur densité hydratée ou de leur composition en apolipoprotéines, les deux étant directement liés. En effet, la densité des lipides étant beaucoup plus faible que celle des

protéines, plus les lipoprotéines seront riches en lipides et plus leur densité sera faible. La classification des lipoprotéines en fonction de leur composition en apolipoprotéines prend en compte la partie protéique la plus active biologiquement. Selon cette classification, il est possible de distinguer les lipoprotéines à apoB (LpB), de faibles densités, et celles à hautes densités (HDL, « *high-density lipoprotein* »). Comme illustré de façon simplifiée dans le **Tableau 3**, il existe de nombreuses lipoprotéines qui diffèrent selon leur taille, leur densité et leur composition (Gotto *et al.* 1986).

**Tableau 3** : Caractéristiques principales des lipoprotéines (d'après Gotto *et al.* 1986)

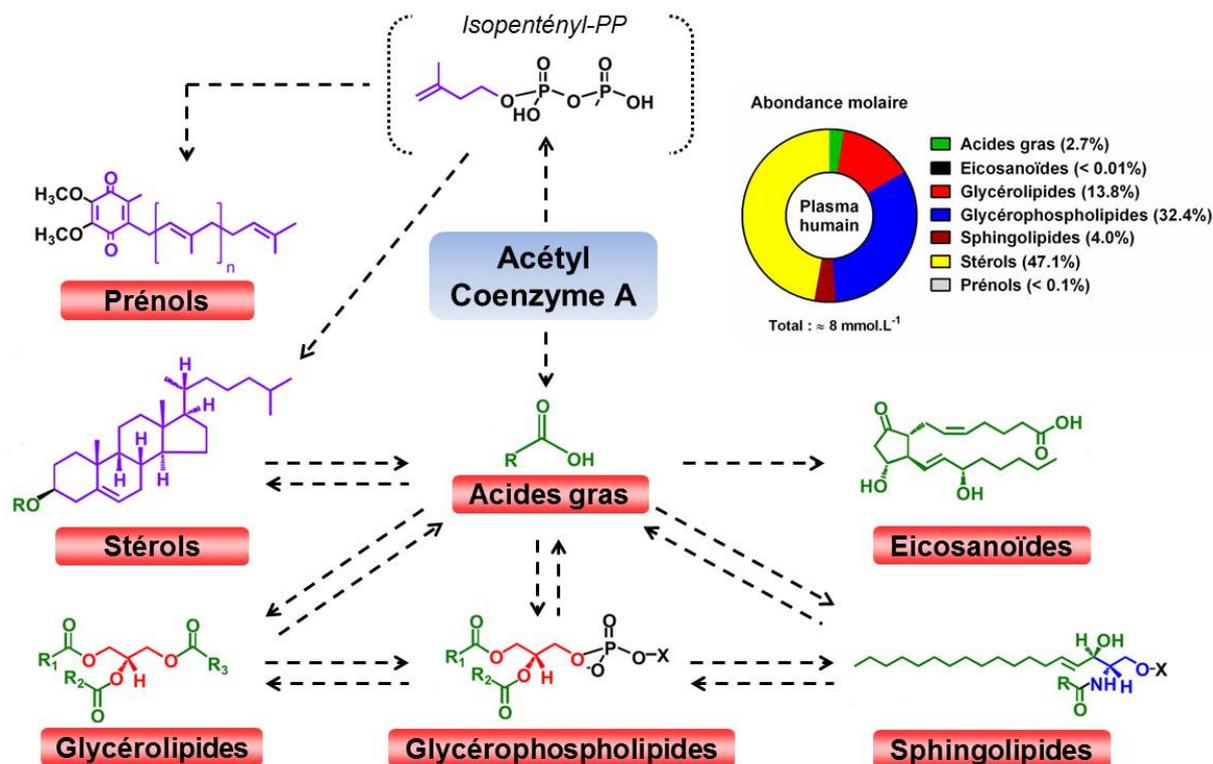
Lipoprotéines	Type	Apolipoprotéines majeures	Densité (g/mL)	Taille (nm)	% (masse) Lipides	Lipides principaux
CM	LpB	B48, A-I, Cs, E	< 0,930	75-1200	98	TG
CM remnant	LpB	B48, E	0,930-1,006	30-80	94	TG, PL, CE, CL
VLDL <sub>1</sub> , VLDL <sub>2</sub>	LpB	B100, Cs, E	0,930-1,006	30-80	90	TG, CE (VLDL <sub>2</sub> )
IDL	LpB	B100, E	1,006-1,019	25-35	83	TG, CE, CL
LDL	LpB	B100	1,019-1,063	18-25	77	CE, CL
Lp(a)	LpB	B100, (a)	1,055-1,120	25	77	CE, CL
HDL <sub>2</sub>	HDL	A-I, A-II	1,063-1,125	9-12	58	CE, CL, PL
HDL <sub>3</sub>	HDL	A-I, A-II, Cs, E	1,125-1,210	5-9	44	CE, CL, PL
Préβ HDL	HDL	A-I	1,210-1,250	5-6	9	CE, CL, PL

CM, chylomicron. VLDL, *very-low-density lipoprotein*. IDL, *intermediate-density lipoprotein*. LDL, *low-density lipoprotein*. Lp(a), lipoprotéine (a). HDL, *high-density lipoprotein*. LpB, lipoprotéines à apoB. Cs, apoC-I, apoC-II et apoC-III.

## 2.2. Les lipides

Les lipides sont des composés à solubilité nulle ou faible dans l'eau mais élevée dans les solvants organiques non polaires. Ils sont soit totalement apolaires ou neutres, soit bipolaires ou amphiphiles, c'est-à-dire composés d'une tête polaire liée à une chaîne fortement apolaire (queue). Ainsi, bien que les lipides soient souvent catégorisés selon les quatre familles citées précédemment (CL, CE, TG et PL), il existe en réalité plusieurs milliers d'espèces lipidiques

interconnectées entre elles par de nombreuses voix et réseaux métaboliques (Quehenberger *et al.* 2010 ; Han 2016). L'ensemble de ces sous-espèces peut être réparti en sept grandes catégories (Figure 17).

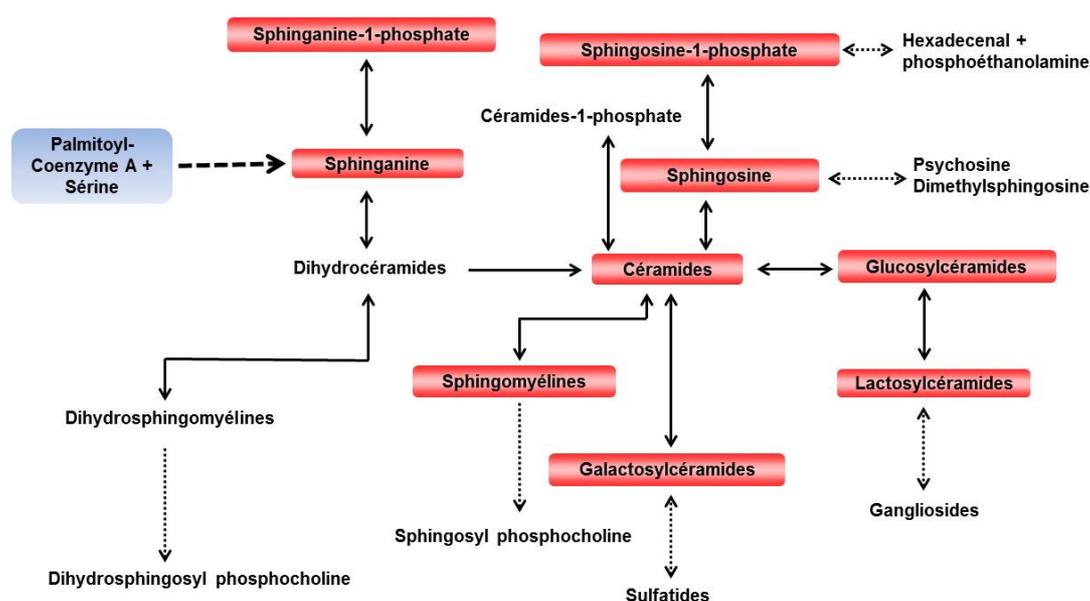


**Figure 17** : Diversité des lipides présents dans le plasma humain et réseaux de connections entre les différentes catégories lipidiques (adapté de Quehenberger *et al.* 2010)

**Aperçu général** - Chez les mammifères, la synthèse des lipides débute par le don de deux carbones provenant de l'Acétyl Coenzyme A, lesquels servent à la construction des acides gras (en vert). Les substituants acyles gras peuvent à leur tour être transférés en partie aux lipides complexes comme les stéroïdes estérifiés, les sphingolipides, les glycérolipides et les glycérophospholipides, ou directement convertis en eicosanoïdes. Une seconde voie majeure dans la biosynthèse des lipides permet de générer un précurseur isoprène à 5 carbones à partir de l'Acétyl Coenzyme A : l'isopentényl-pyrophosphate (en violet). Ce dernier est essentiel à la construction des prényls et des stéroïdes. D'autres constituants, comme le glycérol (en rouge) et la sérine (en bleue), sont également nécessaires à la construction des lipides complexes. À noter que les stéroïdes (47,1 % des lipides plasmatiques humains) sont représentés à plus de 99 % par le cholestérol libre et ses dérivés estérifiés. De même, les glycérolipides (13,8 % des lipides plasmatiques humains) sont à 95 % présents sous la forme de TG. Les PL, quant à eux,

incluent la totalité des glycérophospholipides (32,4 % des lipides plasmatiques humains) et près de 95 % des sphingolipides (4 % des lipides plasmatiques humains). Les dosages cliniques standards focalisés sur les CL, CE, TG et PL permettent donc de réaliser un tapissage global représentatif des lipides sanguins (~ 96 % de constituants lipidiques).

**Les lipides constituent un réseau moléculaire très complexe** – En réalité, il existe plusieurs milliers d'espèces lipidiques interconnectées entre elles par de nombreuses voies métaboliques (Quehenberger *et al.* 2010 ; Gault *et al.* 2010 ; Han 2016) comme l'illustre le réseau des sphingolipides (**Figure 18**). Outre la complexité de ces réseaux et le grand nombre d'espèces sous-jacentes, la diversité structurale des lipides tient en grande partie à la nature de leurs constituants de base : les acides gras. Ces derniers sont majoritairement apportés par l'alimentation (TG alimentaires) et par synthèse endogène à partir du glucose, puis stockés dans le tissu adipeux où leur libération est régulée pour répondre aux besoins en énergie des autres tissus (Hertzel *et al.* 2008). Chimiquement, il s'agit d'acides carboxyliques présentant, à l'état naturel, une chaîne linéaire avec un nombre pair de carbones et majoritairement de 14 à 22. Ils sont saturés ou en partie insaturés avec un nombre maximal de 6 doubles liaisons et de conformation majoritairement *cis*. De par l'ampleur des combinaisons possibles suivant le type et le nombre d'acides gras branchés, plusieurs milliers d'espèces moléculaires et d'isomères peuvent ainsi coexister dans le plasma humain (**Annexe A**). Le **Tableau 4** ci-après présente les abondances molaires et les principales fonctions des différentes sous-espèces lipidiques mesurables dans le plasma par spectrométrie de masse (Quehenberger *et al.* 2010).



**Figure 18** : Réseau métabolique des sphingolipides (adapté de Han 2016)

**Tableau 4 :** Répartition des principaux lipides plasmatiques détectables en spectrométrie de masse et fonctions principales (d'après Han 2016 ; Quehenberger *et al.* 2010)

Famille	Sous-espèces	% molaire	Fonctions principales
Acyls gras	AG libres	2,7	Energie
	Eicosanoïdes	< 0,1	Signalisation
Glycérolipides	TG	13,2	Energie (TG, DG) et signalisation (DG)
	DG	0,7	
Glycérohospholipides	PE, LPE	5,9	Composants membranaires Signalisation
	PC, LPC	25,8	
	PS, PG, PA, PI	0,5	
Sphingolipides	SM	3,8	Composants membranaires Signalisation
	Cer	0,1	
	HexosylCer	< 0,1	
	Sphingoïdes	< 0,1	
Stérols	Libres	10,3	Composants membranaires, vitaux pour le fonctionnement cellulaire Précurseurs des stéroïdes, des sels biliaires et de vitamines
	Estérifiés	36,8	
Prénols	Coenzyme Q	0,1	Transformation de l'énergie

AG, acides gras. TG, triglycérides. DG, diglycérides. PE, phosphatidyléthanolamine. LPE, lysophosphatidyléthanolamine. PC, phosphatidylcholine. LPC, lysophosphatidylcholine. PS, phosphatidylsérine. PG, phosphatidylglycérol. PA, acide phosphatidique PI, phosphatidylinositol. SM, sphingomyélines. Cer, céramides.

**Vers une meilleure caractérisation du lipidome** – Les nouvelles méthodologies lipidomiques disponibles ont facilité la caractérisation détaillée des classes de lipides et des espèces moléculaires présentes dans le plasma ainsi que dans les fractions lipoprotéiques. Ajoutée aux paramètres lipidiques standards mesurés en clinique, la caractérisation détaillée des voies métaboliques potentiellement impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines fournit des détails essentiels sur la composition et les fonctions de ces complexes lors de dérèglements métaboliques associés au risque de développement de l'athérosclérose tels que l'obésité, la résistance à l'insuline, l'hyperlipidémie... (Kannel 1985 ; Kontush & Chapman 2010). A titre d'exemple, des études ont suggéré que les sphingolipides plasmatiques, et en particulier les céramides (0,1 % de lipides plasmatiques), pourraient être des régulateurs clés de l'athérosclérose (Bismuth *et al.* 2008 ; Cheng *et al.* 2015) car ils favorisent l'aggrégation des lipoprotéines athérogènes et perturbent leur catabolisme (Ng *et al.* 2015).

### 2.3. Les apolipoprotéines

Les lipides sont véhiculés dans la circulation en association avec des apolipoprotéines sous la forme de lipoprotéines (Feingold & Grunfeld 2015). Les apolipoprotéines jouent un rôle clé dans le métabolisme et les fonctions des lipoprotéines, et sont de nature et de structure très variées (Tableau 5). Elles peuvent être structurelles et assurer le maintien du complexe, être ligands de récepteurs lipoprotéiques, guider la formation et la sécrétion des lipoprotéines ou même activer/inhiber des enzymes impliquées dans leur métabolisme. Des concentrations anormales en apolipoprotéines sont associées à de nombreux troubles spécifiques du métabolisme lipidique. Les concentrations plasmatiques, et plus particulièrement lipoprotéiques, des apolipoprotéines sont de bons marqueurs de risque des maladies cardiovasculaires (Dominiczak & Caslake 2011). Initialement, les apolipoprotéines (apo) ont été subdivisées en trois sous-familles distinctes selon la nomenclature A, B et C (Lagrost *et al.* 2005). Les apos A furent principalement associées aux lipoprotéines de haute densité (HDL), les apos B aux lipoprotéines de basse densité (LDL) et les apos C à la fois aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et aux HDL. Cette nomenclature a considérablement évolué au cours des trente dernières années en raison de la découverte de nouvelles apos et de profils de distribution spécifique au sein d'autres lipoprotéines plasmatiques telles que les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les chylomicrons (CM) ou plus généralement les lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) incluant les VLDL, les CM et les CM remnants (ou résiduels).

**Les apolipoprotéines de type A** – L'apoA-I est la principale composante structurale des HDL et il existe plusieurs molécules d'apoA-I par particule (entre 2 et 4). Elle représente à elle seule environ 70% des protéines contenues dans les HDL (Cheung & Albers 1982 ; Feng & Li 2009). Sa concentration plasmatique est contrôlée par son taux de catabolisme, les protéines ne pouvant acquérir de lipides étant rapidement dégradées (Dominiczak & Caslake 2011). Elle active la « lécithine cholestérol acyltransférase » (LCAT) et possède des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Klimov *et al.* 1993). Les concentrations en apoA-I sont généralement inversement corrélées avec le risque cardiovasculaire (Dominiczak & Caslake 2011). L'apoA-II est la deuxième protéine de structure des HDL, comptant pour environ 20% des protéines contenues dans cette fraction lipoprotéique (Cheung & Albers 1982), bien que seulement environ deux tiers de ces particules en contiennent. Sa concentration plasmatique est principalement déterminée par son taux de production (Dominiczak & Caslake 2011). Elle sert de cofacteur pour la LCAT et la « *cholesterylester transfer protein* » (CETP). Elle peut remplacer l'apoC-III dans les VLDL et inhiber la

lipoprotéine lipase (LPL) (Boisfert *et al.* 1999 ; Julve *et al.* 2010). L'apoA-II est une protéine homo-dimérique qui pourrait être inversement associée au risque de maladie coronarienne chez l'Homme (Birjmohun *et al.* 2007). L'apoA-IV, quant à elle, est principalement synthétisée par l'intestin lors de la prise alimentaire. Elle est associée aux CM et aux HDL et peut se retrouver libre dans le plasma sans association avec les lipoprotéines. Des études ont suggéré qu'elle jouerait un rôle dans la régulation de la prise alimentaire et dans le métabolisme des TRL (Feingold & Grunfeld 2015). L'apoA-IV module probablement l'activité de la LPL et pourrait activer la LCAT (Weinberg 2002). Enfin, l'apoA-V est principalement associée aux HDL et aux TRL et agit comme activateur de la lipolyse *via* la LPL, jouant ainsi un rôle important dans le métabolisme des TRL (Feingold & Grunfeld 2015). Elle module également la synthèse et la sécrétion des VLDL. Les déficiences en apoA-V ont été associées à la dyslipidémie de type V et à une réduction de l'activité de la LPL post-héparine (Dominiczak & Caslake 2011).

**Les apolipoprotéines de type B** – Il existe un seul gène d'apoB qui est exprimé à la fois dans le foie et dans l'intestin. Chez l'Homme, l'intestin exprime une protéine dont la taille est approximativement 48 % (apoB48) de celle exprimée par le foie (apoB100). Dans l'intestin, un codon stop aboutit à la cessation de la traduction et par conséquent à une apoB plus courte (Hardman & Kane 1986). L'apoB réagit avec les protéines microsomales de transfert de TG afin de former les VLDL (apoB100) ou les CM (apoB48) (Hussain *et al.* 2003). L'apoB100 constitue la principale composante structurale des VLDL, IDL et LDL et il existe une molécule unique par particule. L'apoB100 est aussi un ligand pour le récepteur aux LDL (LDLR) et joue donc un rôle important dans la clairance de ces lipoprotéines (Feingold & Grunfeld 2015). Lorsqu'elle n'est pas assemblée aux lipides, elle est dégradée par la cellule. Des mutations de l'apoB100 peuvent affecter sa liaison au récepteur et entraîner une hypercholestérolémie familiale (Innerarity *et al.* 1990). D'autres mutations de l'apoB100 sont à l'inverse associées à une hypobetalipoprotéinémie familiale (Rimbert *et al.* 2016). L'apoB48 est, quant à elle, la principale protéine de structure des CM et CM remnants et il existe une molécule d'apoB48 par particule. Elle n'est pas reconnue par le LDLR. Les CM remnants sont principalement internalisés par le « *lipoprotein-related receptor protein* » (LRP) *via* l'apoE (Su *et al.* 2009). Des particules inférieures à 70-80 nm peuvent pénétrer dans la paroi vasculaire. Les CM remnants sont donc considérés comme athérogènes. Ces derniers sont également enrichis en CE et PL par échange avec les HDL (Nestel & Barter 1973 ; Berry 2005).

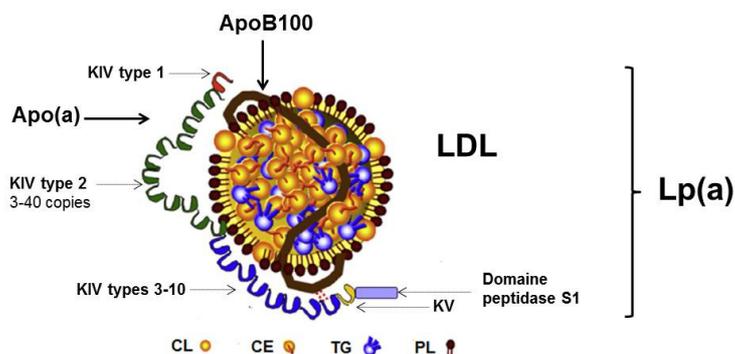
**Les apolipoprotéines de type C** – Les apoC sont synthétisées principalement dans le foie et s'échangent librement entre les particules de lipoprotéines. Elles sont majoritairement associées aux TRL (CM et VLDL) et aux HDL. L'apoC-I active la CETP, inhibe la LPL et la CETP et inhibe les liaisons aux LDLR et LRP (Dominiczak & Caslake 2011). L'apoC-II est un cofacteur de la LPL et stimule donc l'hydrolyse des TG et la lipolyse des VLDL et des CM. La perte de fonctions par mutations dans l'apoC-II entraîne une hypertriglycéridémie marquée due à un défaut de catabolisme des TRL (Feingold & Grunfeld 2015). L'apoC-III, quant à elle, inhibe la LPL et donc l'hydrolyse des TG et inhibe la captation des TRL par le foie. Des mutations fonctionnelles de l'apoC-III entraînent une diminution des TG et réduit le risque de maladie cardiovasculaire. De même, l'inhibition de l'expression de l'apoC-III entraîne une diminution des TG même chez les patients déficients en LPL, ce qui indique que la capacité de l'apoC-III à moduler les taux de TG ne dépend pas uniquement de la régulation de l'activité LPL (Feingold & Grunfeld 2015). L'apoC-III est perçue comme un bon marqueur des maladies cardiovasculaires (Chan *et al.* 2008).

**L'apolipoprotéine E** – L'apoE s'échange entre les lipoprotéines et est associée aux CM, aux CM remnants, aux VLDL, aux IDL et à un sous-groupe de HDL (HDL<sub>3</sub>). L'apoE est un ligand des récepteurs de la famille du LDLR ; le complexe HSPG/LRP (*heparin sulfate proteoglycan/lipoprotein-receptor related protein*) ou le récepteur HSPG seul (Mahley *et al.* 1999 ; Huang 2010). Elle favorise donc la clairance des lipoprotéines riches en TG et a un rôle anti-athérogène. L'apoE contrôle également l'efflux de cholestérol des cellules avec l'apoA-I (Chroni *et al.* 2005), a des propriétés antioxydantes et joue un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire. Il existe trois variantes génétiques courantes de l'apoE : E2 (5-10%), E3 (60-70%) et E4 (15-20%) (Utermann 1987). Les apoE3 et E4 sont des ligands pour le LDLR alors que l'apoE2 est mal reconnue par ce dernier. Les patients homozygotes pour l'apoE2 peuvent développer une dyslipidémie mixte familiale caractérisée par des concentrations élevées de cholestérol et de TG avec un risque accru de maladie coronarienne. L'apoE4 est associée à un risque élevé de maladie d'Alzheimer. La concentration plasmatique en apoE explique 20 à 40% de la variabilité des TG circulants.

**L'apolipoprotéine M** – Les hépatocytes produisent de l'apoM et la sécrètent dans le plasma où elle se lie aux HDL. L'apoM est donc principalement associée aux HDL mais également, dans une moindre mesure, aux lipoprotéines contenant de l'apoB. Elle peut se retrouver libre dans le plasma sans association avec les lipoprotéines. L'apoM appartient à la famille des lipocalines et possède une poche de liaison hydrophobe lui permettant de se lier à

de petits lipides fonctionnels, telle que la sphingosine-1-phosphate (S1P) (Ahnstrom *et al.* 2007 ; Rosen *et al.* 2013 ; Ren *et al.* 2015). L'apoM, seule ou en association avec la S1P, est impliquée dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Zang *et al.* 2003). De multiples facteurs peuvent influencer son expression mais les mécanismes à l'origine de ces processus restent inconnus (Ren *et al.* 2015). L'apoM ou le couple apoM-S1P facilitent la formation des pre $\beta$ HDL et induisent une avalanche d'effets athéroprotecteurs associés aux HDL. Chez les patients atteints de diabète, les taux d'apoM plasmatique peuvent diminuer, tandis que l'augmentation des concentrations d'apoM réduit la glycémie plasmatique et augmente la sécrétion d'insuline (Ren *et al.* 2015).

**L'apolipoprotéine (a) –** L'apo(a) est un homologue du plasminogène, exclusivement synthétisée par le foie et qui se lie de façon covalente à l'apoB100 des LDL pour former la lipoprotéine (a) [Lp(a)] (Figure 19), environ 3,4 fois plus athérogène que les LDL. Une caractéristique importante de l'apo(a) est son polymorphisme structural. Cette dernière est constituée d'un assemblage de sous-unités protéiques appelées « Kringles » (10 de type IV et 1 de type V) et d'un domaine peptidase non fonctionnel (peptidase S1). La réplication génétiquement contrôlée du Kringle IV<sub>2</sub> de 3 à 40 copies est à l'origine de ce polymorphisme structural (Kronenberg & Utermann 2013). Le poids moléculaire de l'apo(a) est donc très variable et la plupart des patients possède deux isoformes de tailles différentes, les isoformes les plus petites semblant être les plus exprimées. En outre, les concentrations plasmatiques en Lp(a) sont très différentes d'un individu à l'autre et varient de 1 à 500 mg/dL (McConnell *et al.* 2014 ; Dominiczak & Caslake 2011). Le taux de synthèse de l'apo(a) est le principal déterminant de sa concentration plasmatique mais les mécanismes de production, de sécrétion, d'assemblage et de catabolisme de la Lp(a) restent encore mal connus et controversés. Néanmoins, des niveaux élevés d'apo(a) et de Lp(a) ont clairement été associés à un risque accru d'athérosclérose (Kronenberg & Utermann 2013).



**Figure 19:** Représentation schématique de la lipoprotéine (a) (McConnell *et al.* 2014)

**Tableau 5** : Principales propriétés des apolipoprotéines (d'après [Dominiczak & Caslake 2011](#))

Apo	Poids moléculaire	Nombre acides aminés	Source principale	Lipoprotéines associées	Concentration plasmatique moyenne	Principales fonctions
ApoA-I	28 079 Da	243	Foie, intestin	HDL, CM	80-160 mg/dL, 30-60 $\mu$ M	Structure des HDL, activatrice de LCAT
ApoA-II	17 416 Da	2 $\times$ 77	Foie, intestin	HDL, CM	30-50 mg/dL, 17-30 $\mu$ M	Structure des HDL, activatrice/inhibitrice de la LPL
ApoA-IV	43 402 Da	396	Foie, intestin	HDL, CM	10-30 mg/dL, 2-7 $\mu$ M	Métabolisme des TRL (postprandial)
ApoA-V	38 905 Da	366	Foie	HDL, CM, VLDL	< 0,1 mg/dL, < 0,025 $\mu$ M	Favorise la lipolyse des TG par la LPL
ApoB48	240 835 Da	2152	Intestin	CM	< 5 mg/dL, < 0,2 $\mu$ M	Structure des CM, ligand du récepteur B48R (postprandial)
ApoB100	512 858 Da	4536	Foie	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	60-120 mg/dL, 1-3 $\mu$ M	Structure des VLDL, IDL, LDL, Lp(a), ligand du récepteur aux LDL
ApoC-I	6 627 Da	83	Foie, intestin	HDL, CM, VLDL	3-10 mg/dL, 5-15 $\mu$ M	Activatrice de LCAT, inhibitrice de CETP
ApoC-II	8 204 Da	101	Foie, intestin	HDL, CM, VLDL	1-10 mg/dL, 1-10 $\mu$ M	Activatrice et cofacteur de la LPL
ApoC-III	8 765 Da	99	Foie, intestin	HDL, CM, VLDL	5-25 mg/dL, 6-30 $\mu$ M	Inhibitrice de la LPL et de la clairance des TRL
ApoE	34 237 Da	317	Foie, intestin, cerveau, rein, rate	HDL, CM remnants, VLDL	3-6 mg/dL, 1-2 $\mu$ M	Ligand du récepteur aux LDL (HSPG/LRP)
ApoM	21 253 Da	188	Foie, rein	HDL, LDL	~ 2,1 mg/dL, ~ 1,0 $\mu$ M	Chaperonne de petits lipides fonctionnels (S1P)
Apo(a)	> 180 000 Da	> 1465	Foie	Lp(a)	Dépend du poids moléculaire (mg/dL), < 0,5 $\mu$ M	Inhibitrice de l'activation du plasminogène, composante de la Lp(a)

## 3. LE MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES

### 3.1. Généralités

Les lipoprotéines sont des complexes lipides-protéines de haut poids moléculaire présentant une monocouche membranaire de lipides amphiphiles (PL et CL) et un cœur composé de lipides apolaires (TG et CE), l'ensemble étant associé à des apolipoprotéines (Brewer 1981). Les apolipoprotéines jouent un rôle clé dans la reconnaissance des lipoprotéines par les récepteurs et les enzymes impliqués dans leur métabolisme (Dominiczak & Caslake 2011).

Les lipoprotéines assurent le transport des lipides hydrophobes d'un tissu à l'autre par le plasma sanguin. Durant leur migration et sous l'action d'enzymes spécifiques, les lipoprotéines subissent de nombreuses modifications complexes affectant leur composition, leur structure et leurs fonctions. Elles sont captées par des récepteurs spécifiques ou non-spécifiques afin de délivrer leur contenu aux cellules. Celles-ci l'utilisent et le transforment afin de produire de l'énergie et d'assurer leur survie et leur développement, ou pour le stocker. Outre leurs propriétés propres, ce sont les propriétés fonctionnelles des lipoprotéines qui ont suscité un intérêt majeur au cours des trois dernières décennies. Ainsi, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre l'implication de chaque classe de lipoprotéine dans le transport des lipides. Lorsque l'on parle de métabolisme des lipoprotéines (Figure 20), il est important de distinguer trois compartiments : l'intestin, le foie et les tissus périphériques (Lagrost *et al.* 2005 ; Feingold & Grunfeld 2015).

Lors de la prise d'un repas, l'intestin absorbe les lipides alimentaires et les intègre dans des lipoprotéines de grande taille et riches en TG : les chylomicrons (CM). Les CM permettent le transport entéro-hépatique des lipides au cours duquel les TG sont hydrolysés puis captés par les tissus périphériques (muscle, tissu adipeux) pour y être stockés ou dégradés à des fins énergétiques. Il s'agit de la voie exogène (Figure 20) (Dallinga-Thie *et al.* 2010 ; Abumrad & Davidson 2012). Le foie, quant à lui, a un rôle central dans la régulation métabolique et le transport des lipides dans l'organisme. Il prend en charge les lipides intestinaux résiduels et ceux issus de la synthèse endogène, et les intègre dans de nouvelles lipoprotéines afin de les distribuer aux tissus périphériques. Cette voie, appelée endogène, consiste en une cascade impliquant les VLDL, les IDL et les LDL (Figure 20) (Tiwari & Siddiqi 2012). Les tissus périphériques captent les lipides par le biais de l'endocytose et de l'hydrolyse des

lipoprotéines d'origine hépatique ou intestinale. Comme aucun tissu périphérique ne peut métaboliser le cholestérol en excès, ils ont recours aux HDL pour retourner l'excédent vers le foie où il sera éliminé par la voie biliaire. Il s'agit de la voie transport inverse (**Figure 20**) (Zhao *et al.* 2010 ; Rosenson *et al.* 2012 ; Rye & Barter 2014).

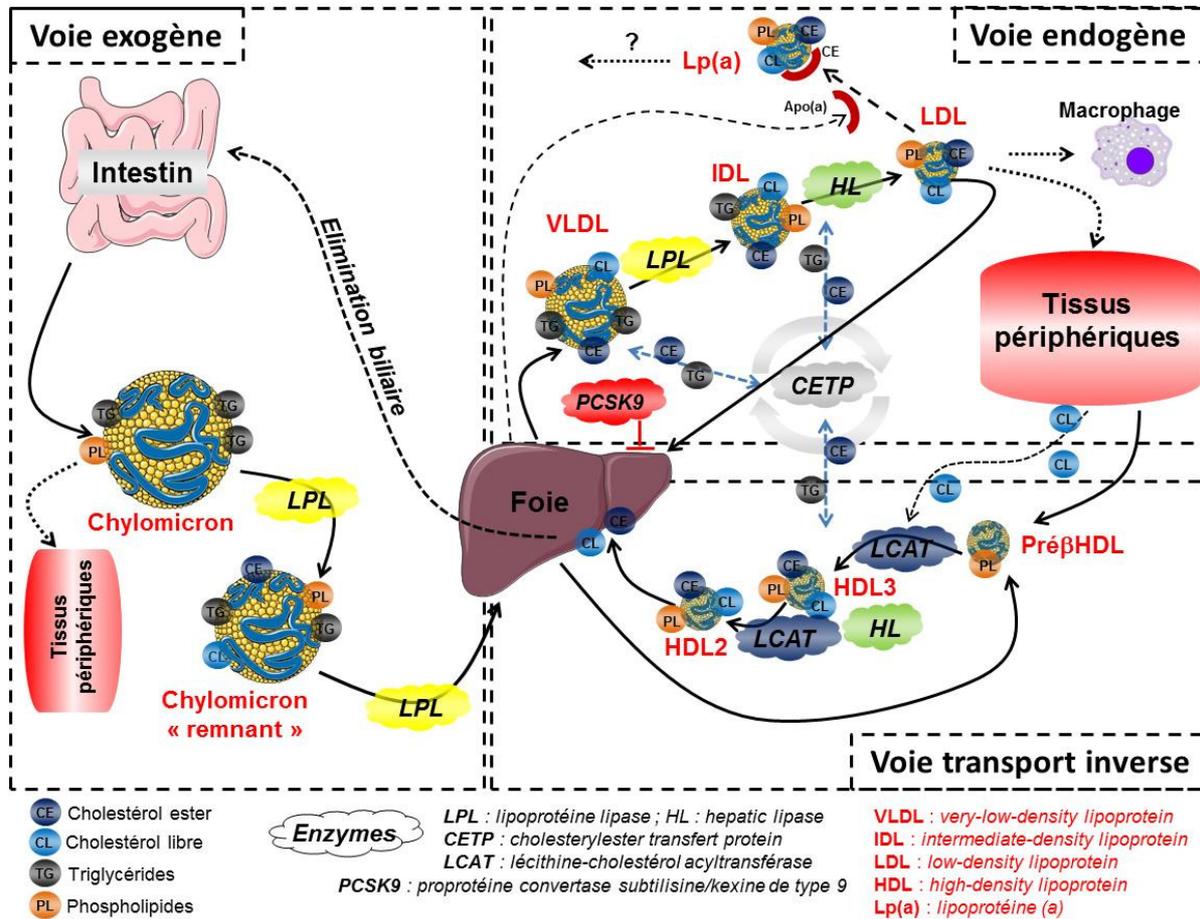


Figure 20 : Vue globale du métabolisme des lipoprotéines (adapté de Lagrost *et al.* 2005)

### 3.2. La voie exogène

**Absorption des matières grasses** – Lors de la prise d'un repas, les TG alimentaires sont hydrolysés dans l'intestin en acides gras (AG) et en monoacylglycérols (MG) sous l'action de lipases intestinales. Ces résidus sont ensuite émulsifiés avec des sels biliaires, du CL du bol alimentaire ou de la bile, des stérols végétaux et des vitamines liposolubles pour former des micelles qui seront transportées dans les cellules intestinales. L'absorption du CL et des stérols végétaux de la lumière intestinale aux entérocytes est facilitée par un transporteur, le NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like protein 1*). Une fois dans la cellule, ces stérols peuvent retourner à la lumière intestinale par l'intermédiaire des transporteurs ABC (*ATP-binding*

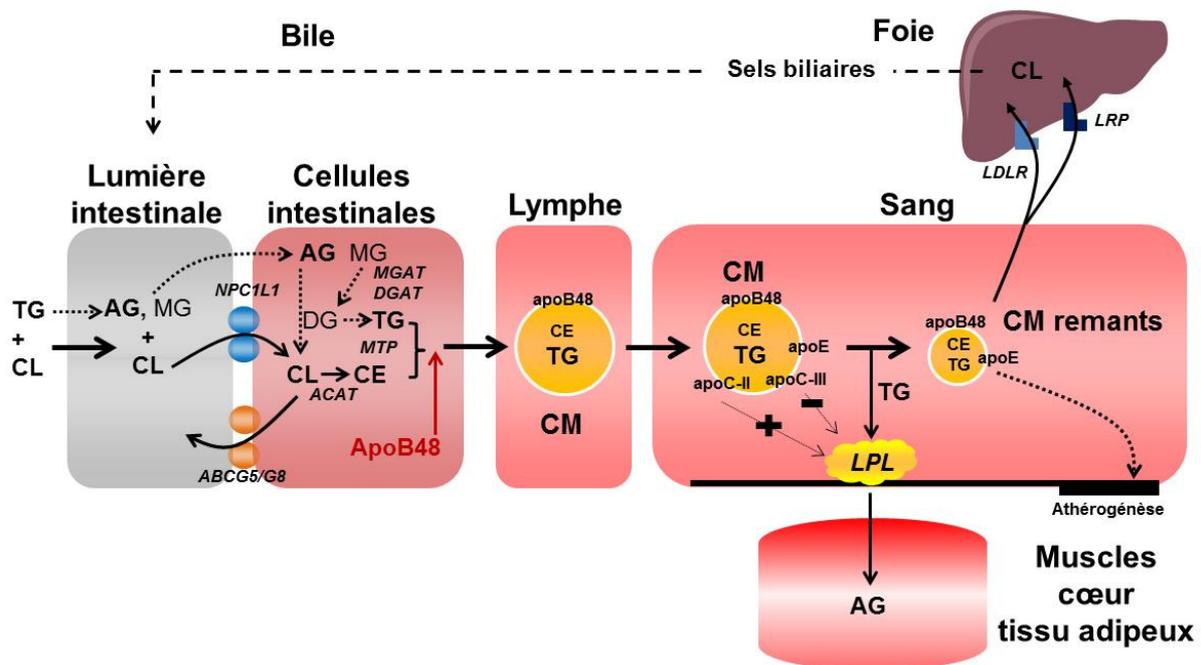
*cassette*) de type G5 et G8, ou convertis en esters de stérol par « l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase » (ACAT). Contrairement au CL, les stérols végétaux sont de mauvais substrats pour l'ACAT. Par conséquent, chez l'Homme, seulement 5 % des stérols végétaux alimentaires sont absorbés, le reste étant transportés hors des entérocytes vers la lumière intestinale. Les transporteurs ABCG5, ABCG8 et l'ACAT permettent donc l'exclusion entérocytaire des stérols végétaux et jouent probablement un rôle important dans l'efficacité de l'absorption du CL. Les voies d'absorption des AG libres et des MG ne sont pas clairement définies à ce jour. Il est fort probable que la diffusion des AG soit passive ou médiée par des transporteurs spécifiques comme les CD36 (*cluster of differentiation 36*) et les FATP (*fatty acid transport protein*) (Abumrad & Davidson 2012 ; Feingold & Grunfeld 2015).

**La formation des chylomicrons** - Les AG et MG absorbés vont être utilisés pour synthétiser les diacylglycérols (DG) *via* la « monoacylglycérol acyltransférase » (MGAT), puis les TG *via* la « diacylglycérol acyltransférase » (DGAT). Les TG et les CE, préalablement formés par l'ACAT, sont ensuite conditionnés avec l'apoB48 pour former les CM dans le réticulum endoplasmique. La formation des CM nécessite une protéine de transfert des TG : la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*). L'absence de MTP entraîne l'incapacité de former des CM (Powell *et al.* 1987 ; Abumrad & Davidson 2012 ; Feingold & Grunfeld 2015).

**Métabolisme des chylomicrons** – Une fois formés, les CM sont sécrétés dans la lymphe et délivrés à la circulation. L'activation de la LPL par l'apoC-II et l'apoA-V permet l'hydrolyse des TG contenus dans les CM conduisant à la formation d'AG libres absorbés par les cellules musculaires et les adipocytes, *via* les FATP et CD36, pour produire ou stocker de l'énergie. Certains AG libérés par les CM se lient également à l'albumine afin d'être transportés vers d'autres tissus. Les pertes de fonction de la LPL, de l'apoC-II et de l'apoA-V entraînent une hypertriglycéridémie marquée ou chylomicronémie. A l'inverse, l'apoC-III inhibe l'activité de la LPL et une perte de fonction de l'apoC-III est par conséquent associée à une augmentation de l'activité LPL diminuant les TG plasmatiques. L'expression de la LPL par les cellules musculaires et les adipocytes est régulée par les hormones, en particulier l'insuline, l'état nutritionnel et le statut inflammatoire. D'autres protéines nécessaires à la maturation et à la stabilisation de la LPL à la surface des cellules endothéliales ont également un rôle important dans le métabolisme des CM. L'hydrolyse des TG par la LPL entraîne une diminution marquée de la taille des CM conduisant à la formation de CM résiduels ou CM remnants, enrichis en CE et pouvant acquérir de l'apoE. Comme ces particules diminuent en taille, les

PL et certaines apolipoprotéines contenus à la surface sont transférés vers d'autres lipoprotéines, principalement les HDL. Le transfert de l'apoC-II des CM remnants vers les HDL diminue la capacité de la LPL à hydrolyser davantage les TG. Les CM remnants sont alors éliminés de la circulation par le foie *via* le LDLR et d'autres récepteurs hépatiques tels que le LRP (HSPG/LRP). L'apoE a un rôle central dans ce processus à l'exception de l'isoforme E2 qui est associée à une diminution de la clairance des CM et des élévations des taux de cholestérol (CL et CE) et TG plasmatiques (Dallinga-Thie *et al.* 2010 ; Feingold & Grunfeld 2015).

**En résumé** – La voie exogène entraîne un transfert efficace des AG alimentaires vers le muscle et le tissu adipeux pour l'utilisation et le stockage de l'énergie. Le cholestérol est délivré au foie où il peut être utilisé pour la formation des VLDL et des acides biliaires (retour à l'intestin *via* la bile). Chez les individus sains, cette voie peut traiter de grandes quantités de graisse sans entraîner une augmentation marquée des TG plasmatiques. La **Figure 21** résume de façon schématique les processus liés à la voie exogène.



**Figure 21** : Représentation schématique de la voie métabolique exogène (adapté de Feingold & Grunfeld 2015)

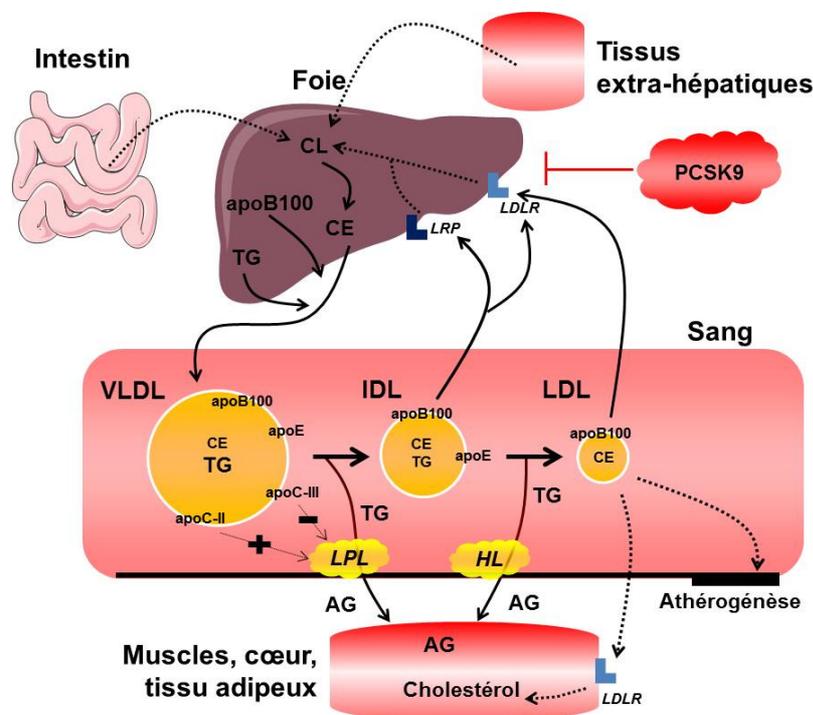
### 3.3. La voie endogène

**Formation des VLDL** – Quelques heures à la suite d'un repas, la quantité de CM circulants devient faible et les besoins en TG de l'organisme sont alors assurés par des lipides synthétisés par le foie ou recyclés par celui-ci. Les TG et CE hépatiques sont ainsi transférés vers l'apoB100 dans le réticulum endoplasmique *via* la MTP afin de former les VLDL. Si l'apport en TG est limité, l'apoB100 nouvellement synthétisée est rapidement dégradée. La MTP est nécessaire à l'addition des lipides hépatiques aux particules d'apoB100. La perte de mutations fonctionnelles de l'apoB100 ou de la MTP entraîne une sous-production de VLDL et une diminution marquée des taux plasmatiques en TG et en cholestérol (hypobétalipoprotéïnémie ou abétalipoprotéïnémie) (Tiwari & Siddiqi 2012 ; Feingold & Grunfeld 2015).

**Métabolisme des VLDL** - Les VLDL sécrétées (VLDL<sub>1</sub> puis VLDL<sub>2</sub>) reçoivent des HDL des apolipoprotéines échangeables telles que l'apoE, l'apoC-II et l'apoC-III. Les VLDL sont ensuite transportées vers les tissus périphériques où les TG sont hydrolysés *via* la LPL, libérant les AG. Comme pour les CM, la LPL est activée et inhibée respectivement par les apoC-II et apoC-III, et l'élimination des TG des VLDL entraîne la formation des IDL. Ces particules sont enrichies en CE et en apoE. Comme pour les CM remnants, les IDL peuvent être captées par le foie par liaison de l'apoE aux LDLR et LRP (HSPG/LRP). Cependant, alors que la grande majorité des CM remnants est éliminée de la circulation par le foie, seule une fraction des IDL sera captée. Les TG résiduels des IDL sont alors hydrolysés par la « lipase hépatique » (HL, *hepatic lipase*) conduisant à la formation des LDL contenant majoritairement du cholestérol (CL et CE) et de l'apoB100 (Tiwari & Siddiqi 2012 ; Feingold & Grunfeld 2015).

**Métabolisme des LDL** - Les niveaux de LDL plasmatiques sont déterminés par leurs taux de production et de catabolisme, tous deux régulés par la quantité de LDLR hépatique. En effet, une activité élevée du LDLR entraîne une augmentation de l'absorption des IDL et donc une diminution de la production des LDL. D'autre part, environ 70% des LDL sont éliminés par l'endocytose médiée par le LDLR des hépatocytes, le reste étant absorbé par les tissus extra-hépatiques. L'apoB100 contrôle l'internalisation des LDL par le LDLR bien que son affinité soit plus faible que celle de l'apoE (LDLR ⇔ récepteur apoB/E). Le temps de résidence des LDL dans la circulation est plus important que celui des CM remnants et des IDL (Dominiczak & Caslake 2011). Une augmentation du nombre de LDLR hépatiques

augmente la clairance des LDL conduisant à une diminution de leurs taux plasmatiques et inversement. Les niveaux de LDLR hépatique sont principalement régulés par la teneur en cholestérol de la cellule. De façon simplifiée, si la teneur en cholestérol cellulaire est abaissée, la synthèse et l'activité du LDLR sont augmentées pour permettre une absorption accrue de cholestérol contenu dans les LDL (LDL-C). Ainsi, la cellule peut détecter la disponibilité du cholestérol dans ses membranes et réguler l'activité du LDLR (Tiwari & Siddiqi 2012 ; Feingold & Grunfeld 2015). Des mutations du LDLR affectant son efficacité ou son expression sont des causes génétiques de l'hypercholestérolémie familiale. Des concentrations élevées de LDL-C ont été associées à un risque accru de pathologies cardiovasculaires (Marais *et al.* 2012 ; Seidah *et al.* 2014). Une protéine circulante, la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), se lie aux LDLR et augmente sa dégradation lysosomale dans les cellules hépatiques. PCSK9 ralentit donc le captage et la dégradation du LDL-C augmentant ainsi ses taux plasmatiques (Lagace 2014). PCSK9 est par conséquent un inhibiteur naturel du LDLR sécrété principalement par l'hépatocyte (Marais *et al.* 2012). Des mutations permettant un gain de fonctionnalité de PCSK9 sont l'une des causes génétiques de l'hypercholestérolémie familiale caractérisée par des taux élevés de LDL-C. Inversement, des mutations induisant une perte de fonctionnalité ont été associées à de faibles concentrations de LDL-C et à des réductions du risque de maladies coronariennes (Farnier 2014).



**Figure 22** : Représentation schématique de la voie métabolique endogène (adapté de Feingold & Grunfeld 2015)

**En résumé** - La voie endogène facilite le déplacement des TG synthétisés dans le foie vers les muscles et le tissu adipeux. En outre, elle fournit une voie pour le transport du cholestérol hépatique vers les tissus périphériques. La **Figure 22** résume de façon schématique les processus liés à la voie endogène.

### 3.3. La voie transport inverse

**Formation des HDL** – La formation des HDL est initiée par la synthèse de l'apoA-I. Cette dernière est principalement produite par le foie et l'intestin puis sécrétée. L'apoA-I capte ensuite le CL et les PL efflués par les hépatocytes et les entérocytes. Cet efflux lipidique vers l'apoA-I nouvellement synthétisée permet la formation des HDL naissantes, ou préβHDL, et est facilité par le transporteur ABCA1. Chez les patients ayant des mutations fonctionnelles de l'ABCA1 (maladie de Tangier), la captation des CL et PL par l'apoA-I est impossible conduisant à son catabolisme rapide et à des taux de HDL très faibles. Les HDL acquièrent également des lipides d'autres tissus comme les cellules musculaires, les adipocytes et les tissus exprimant ABCA1, ainsi que des TRL lors de leur hydrolyse par la LPL sous l'action de protéines de transfert (CETP, PLTP). Cela explique les niveaux plus faibles de cholestérol contenu dans les HDL (HDL-C) chez les patients présentant des carences dans le catabolisme des TRL conduisant à des taux élevés de TG plasmatiques. La protéine de transfert des PL, la « *phospholipid transfer protein* » (PLTP), facilite également le déplacement des PL entre les lipoprotéines et la lipolyse des TRL conduit au transfert d'apolipoprotéines des TRL vers les HDL (Rosenson *et al.* 2012 ; Rye & Barter 2014 ; Feingold & Grunfeld 2015).

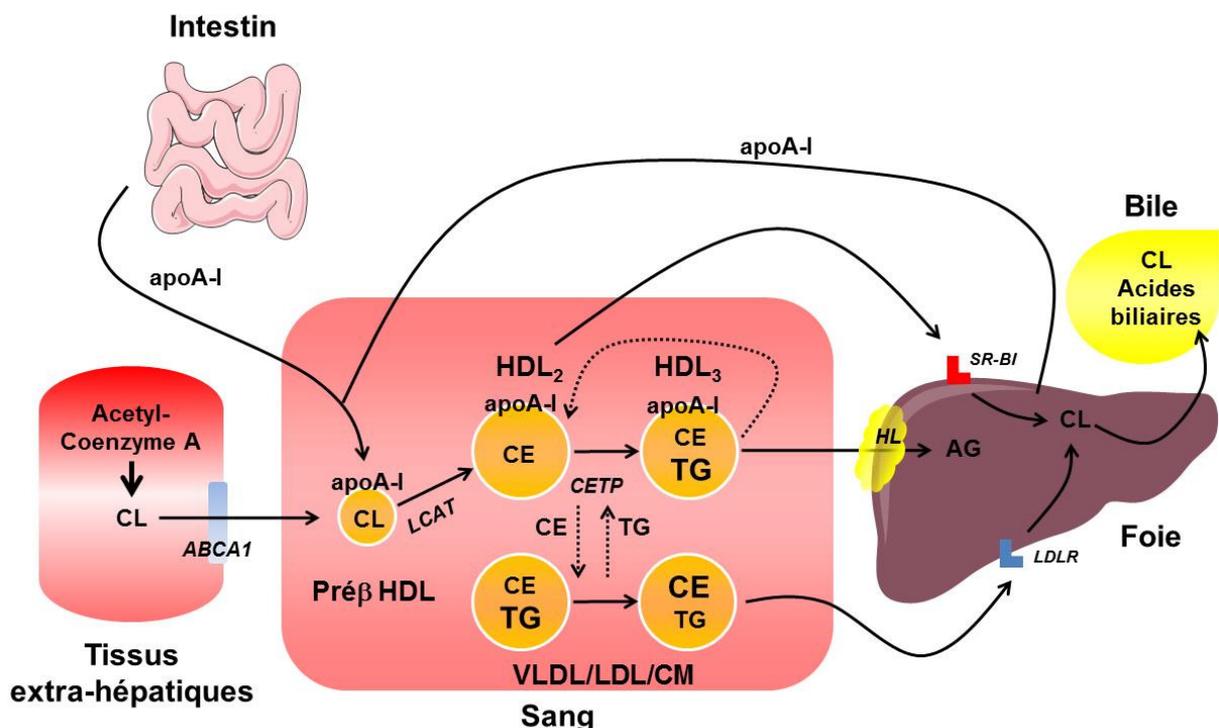
**Estérification du HDL cholestérol** - Le cholestérol efflué des cellules vers les HDL est sous sa forme libre et est localisé à la « surface » des particules. Pour former de grosses particules sphériques et matures (HDL<sub>3</sub> puis HDL<sub>2</sub>), le CL doit être estérifié. La LCAT, enzyme associée aux HDL, catalyse le transfert d'un acide gras des PL vers le CL, entraînant la formation de CE très hydrophobes. Les CE formés sont alors capable de se déplacer de la surface des HDL jusqu'au centre. L'apoA-I est un activateur de LCAT et facilite ce processus d'estérification. L'activité LCAT est nécessaire pour la formation de grosses particules de HDL. Une déficience de LCAT chez l'Homme entraîne une diminution des taux de HDL-C et d'apoA-I et un pourcentage plus important de petites particules de HDL (Dominiczak & Caslake 2011 ; Rosenson *et al.* 2012 ; Rye & Barter 2014 ; Feingold & Grunfeld 2015).

**Métabolisme des HDL** - Les lipases et les protéines de transfert jouent un rôle clé dans la détermination de la taille et de la composition des HDL. Les CE localisés au centre des HDL peuvent être transférés à des particules contenant de l'apoB100 en échange de TG. Ce transfert est médié par la CETP et conduit à un enrichissement en TG des HDL, qui peuvent alors être métabolisés par des lipases. Les patients déficients en CETP ont des taux de HDL-C élevés et des taux de LDL-C bas. Les TG, transférés aux HDL sous l'action de la CETP, sont catabolisés par la HL, réduisant la taille des particules et libérant de l'apoA-I qui sera ensuite dégradée. L'activité de la HL est augmentée avec la résistance à l'insuline ce qui conduit à une réduction des taux de HDL-C. La lipase des cellules endothéliales est une phospholipase qui hydrolyse les PL transportés dans les HDL. Une augmentation de son activité entraîne également une diminution des taux de HDL-C. Le HDL-C est principalement livré au foie et son absorption est sélectivement médiée par le SR-BI (*scavenger receptor class B member 1*). L'apoA-I est catabolisée indépendamment du HDL-C et en majeure partie par les reins puis le foie. Le degré de lipidation de l'apoA-I détermine sa vitesse de catabolisme. Les états pathologiques qui se traduisent par des HDL pauvres en lipides conduisent au catabolisme accéléré de l'apoA-I par le rein. L'apoA-I se lie à la cubiline qui, conjointement avec la mégaline, conduit à son absorption et à sa dégradation. Alors que le foie est également impliqué dans le catabolisme de l'apoA-I, les mécanismes impliqués restent mal compris. Les HDL contiennent de l'apoE et il est donc possible que cette dernière permette leur catabolisme *via* le LDLR et le LRP (HSPG/LRP) (Dominiczak & Caslake 2011 ; Rosenson *et al.* 2012 ; Rye & Barter 2014 ; Feingold & Grunfeld 2015).

**Transport inverse du cholestérol** - Les cellules périphériques accumulent le cholestérol par l'absorption des lipoprotéines circulantes et sa synthèse *de novo*. La plupart des cellules ne peuvent pas cataboliser le cholestérol qui devient toxique en excès. Pour que les cellules diminuent leur teneur en cholestérol, son efflux est alors nécessaire. D'un point de vue clinique, la capacité des macrophages pour effluer efficacement le cholestérol peut jouer un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose. L'ABCA1 joue un rôle majeur dans l'efflux du cholestérol vers les pre $\beta$ HDL, pauvres en lipides. En outre, la diffusion passive du cholestérol de la membrane plasmique vers les HDL peut également contribuer à son efflux. Les niveaux d'ABCA1 et d'ABCG1 sont augmentés par l'activation du LXR (*liver X receptor*) *via* les oxystérols eux-mêmes associés aux concentrations intracellulaires élevées en cholestérol. Plusieurs facteurs de transcription régulant l'expression du LXR (efflux), et du LDLR (internalisation), sont fortement impliqués dans l'équilibre cellulaire des niveaux de

cholestérol. Une fois transféré aux HDL, le cholestérol est pris en charge selon les deux voies énoncées précédemment : la captation du HDL-C par le SR-BI hépatique ou son transfert vers les lipoprotéines contenant de l'apoB100 (CETP) suivi de leur internalisation par le LDLR hépatique. Après captation hépatique, le cholestérol peut être éliminé selon plusieurs mécanismes. Il peut être sécrété dans la bile directement ou après conversion en acide biliaire. Les transporteurs ABCG5 et ABCG8 favorisent l'efflux biliaire et l'expression de ces gènes est renforcée par l'activation du LXR par les oxystérois (von Eckardstein *et al.* 1994 ; Bruckert & Hansel 2007 ; Florentin *et al.* 2008 ; Rye & Barter 2014 ; Feingold & Grunfeld 2015).

**En résumé** - Le transport inverse du cholestérol joue un rôle important dans la protection contre le développement de l'athérosclérose par l'épuration du cholestérol excédentaire des parois vasculaires. Il convient cependant de noter que les taux de HDL-C peuvent ne pas être indicatifs de la voie inverse. En effet, cette dernière implique un certain nombre d'étapes que le HDL-C ne reflète pas nécessairement. La **Figure 23** résume de façon schématique les processus liés à la voie de transport inverse du cholestérol.



**Figure 23** : Représentation schématique de la voie de transport inverse du cholestérol (adapté de Feingold & Grunfeld 2015)

## 4. METHODES DE MARQUAGE POUR L'ANALYSE DES FLUX

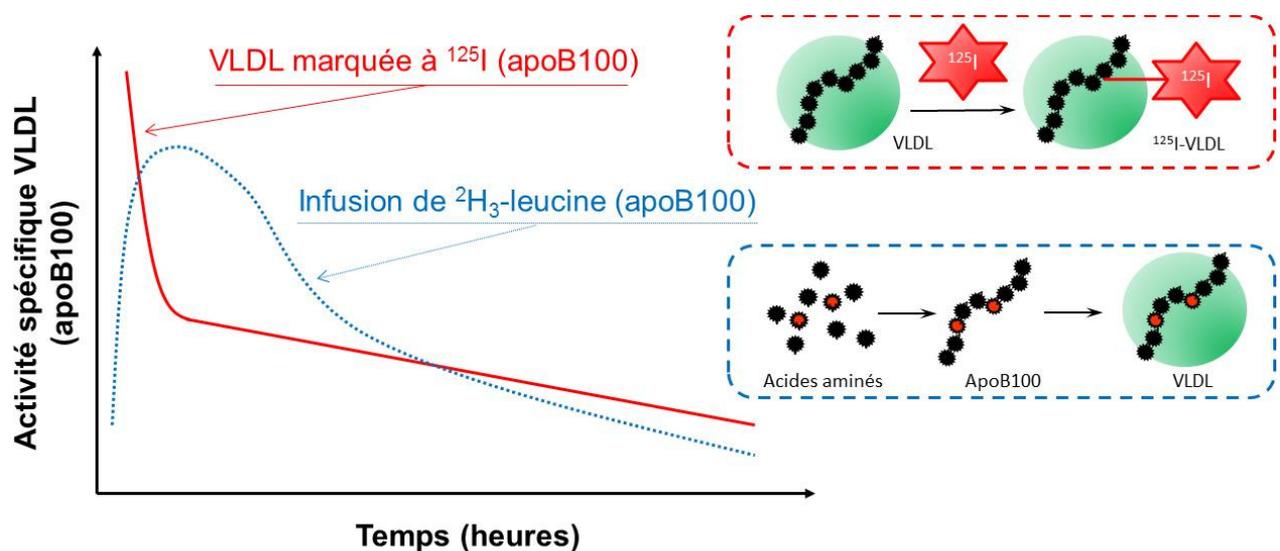
### 4.1. Conception des études cinétiques

**Contexte** – Durant de nombreuses années, la mesure des concentrations des lipoprotéines plasmatiques a fourni de précieuses informations sur la complexité du métabolisme humain. D'un point de vue fonctionnel, ces données ne reflètent qu'un état d'équilibre à un moment précis. Le seul moyen d'étudier de façon dynamique ces systèmes complexes est l'entreprise d'études cinétiques par la méthodologie des traceurs (Barrett *et al.* 2006 ; Castro-Perez *et al.* 2011).

**Notion de traceurs** – Les traceurs sont utilisés dans les études cinétiques pour caractériser les voies métaboliques des lipides, des apolipoprotéines et, par extension, des lipoprotéines lorsqu'une apolipoprotéine de structure est étudiée, comme par exemple l'apoB100 (VLDL, IDL, LDL) ou l'apoA-I (HDL) (Barrett *et al.* 2006). Il est possible de distinguer deux approches dans le choix des traceurs. La méthode utilisant des traceurs exogènes consiste à injecter une particule (lipide, protéine) chimiquement modifiée afin d'assurer sa détection spécifique de l'espèce naturellement présente dans l'organisme. La mesure de la disparition du traceur exogène au cours du temps reflète le taux de catabolisme de l'espèce d'intérêt dont la production pourra être ensuite déduite mathématiquement (Gitlin *et al.* 1958 ; Bilheimer *et al.* 1972 ; Magot *et al.* 1991). L'autre méthode consiste à utiliser un traceur endogène, c'est-à-dire un précurseur de synthèse également modifié chimiquement, puis de mesurer son intégration au sein de l'espèce d'intérêt au cours du temps. Cette méthode est plus précise car elle permet d'accéder directement aux taux de production et de catabolisme. Néanmoins, l'ensemble du métabolisme du traceur est à prendre en compte lors de l'analyse des données qui deviennent ainsi plus complexes (Cryer *et al.* 1985 ; Ouguerram *et al.* 2002 ; Barrett *et al.* 2006). Pour ces deux méthodes, les traceurs doivent être injectés en quantité suffisante pour être détectés au cours du temps sans pour autant perturber le système biologique d'étude. Ils doivent donc être le plus proche possible chimiquement de l'espèce d'intérêt et administrés à des concentrations physiologiques (Barrett *et al.* 2006).

**Méthode exogène par radio-marquage** – Jusqu'à la fin des années 1990, le mode préférentiel de marquage protéique ou lipidique couramment utilisé était la voie exogène combinée à l'utilisation d'éléments radioactifs tels que le tritium ( $^3\text{H}$ ), le carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) et

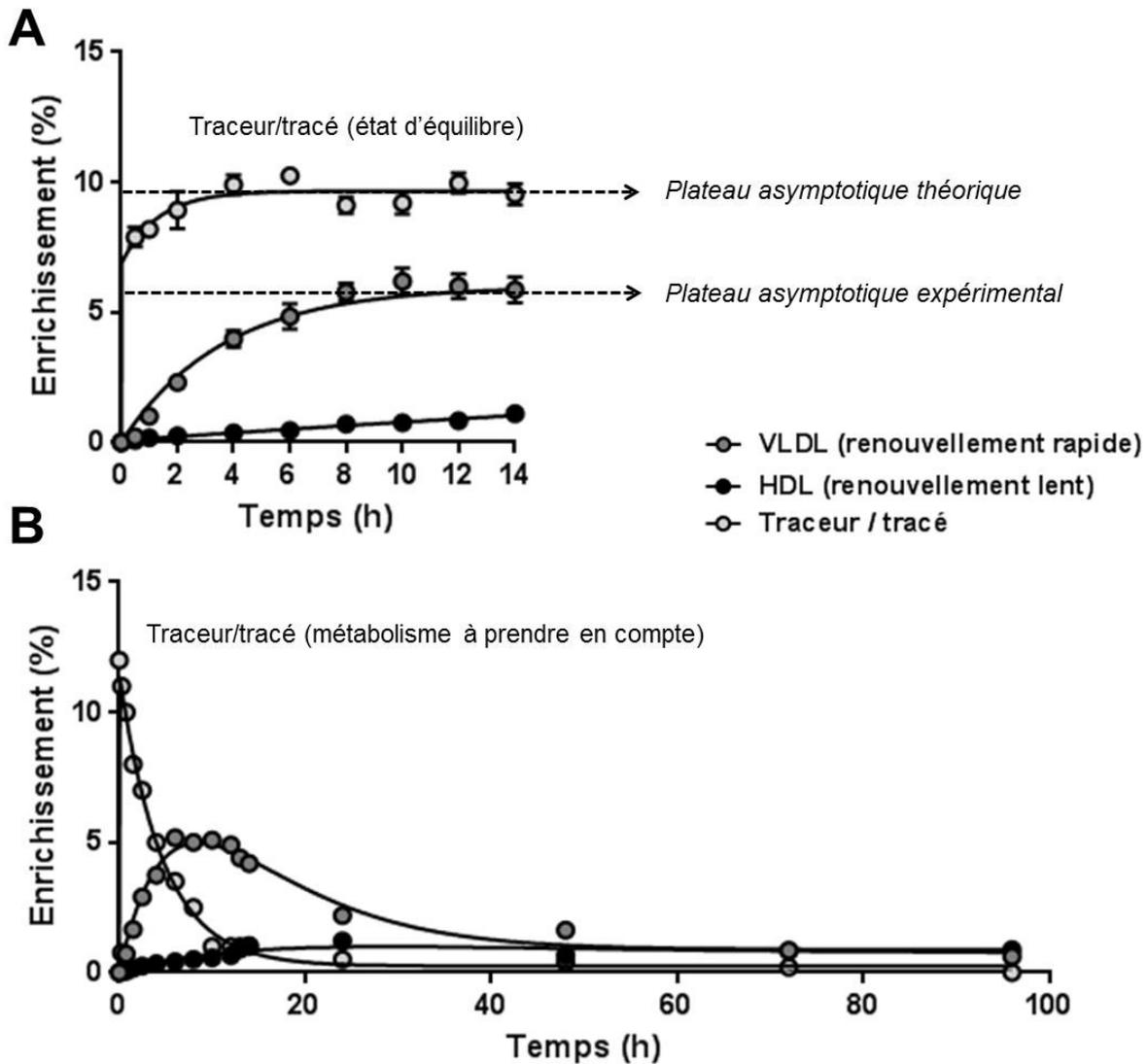
l'iode 125 ( $^{125}\text{I}$ ). Dans le cas du marquage protéique, les lipoprotéines étaient isolées, marquées *in vitro* à l'aide de l'élément radioactif (le plus souvent  $^{125}\text{I}$ ), puis réinjectées généralement par bolus intraveineux aux patients (McFarlane 1958). Dans le cas des lipides, l'espèce radiomarquée (le plus souvent aux  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) était directement injectée aux patients (Magot *et al.* 1991). La décroissance de la radioactivité était ensuite mesurée au cours du temps, permettant ainsi d'étudier le catabolisme de l'espèce d'intérêt (Figure 24), mais ce mode de marquage présentait de sérieuses limitations éthiques et méthodologiques. Cependant, ces méthodes servent toujours de références aujourd'hui (Beltz *et al.* 1985 ; Patterson & Lee 1986 ; Ramakrishnan *et al.* 1990).



**Figure 24** : Cinétiques de VLDL obtenues après administration exogène de VLDL marquées à l'iode 125 ou administration endogène de  $^2\text{H}_3$ -leucine (enrichissements mesurés pour l'apoB100 des VLDL) (Barrett *et al.* 2006)

**Méthode endogène et isotopes stables** – Depuis le début des années 1990, l'intégration d'isotopes stables, tels que le deutérium ( $^2\text{H}$ ), le carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ), l'azote 15 ( $^{15}\text{N}$ ) et l'oxygène 18 ( $^{18}\text{O}$ ), a permis l'essor des méthodes endogènes (Lichtenstein *et al.* 1990 ; Schaefer *et al.* 1992 ; Ouguerram *et al.* 2002 ; Sun *et al.* 2013). En effet, ces isotopes n'émettent pas de radioactivité mais peuvent être suivis par spectrométrie de masse du fait qu'ils apportent un décalage en masse, et donc du rapport  $m/z$ , de l'espèce d'intérêt nouvellement synthétisée (+1 pour un  $^2\text{H}$ , un  $^{13}\text{C}$ , un  $^{15}\text{N}$  ; +2 pour un  $^{18}\text{O}$ ). Lors du traçage endogène, il est possible de suivre la production puis la dégradation d'une ou de plusieurs espèces simultanément (Figure 24). Le choix du traceur demeure cependant primordial. En effet, son propre métabolisme est à prendre en compte avant même d'étudier son implication

dans la synthèse de l'espèce d'intérêt (Patterson *et al.* 1991 ; Previs *et al.* 2014). Deux approches expérimentales majeures sont utilisées pour l'administration des traceurs chez l'Homme : une forte dose administrée en bolus intraveineux ou une dose modérée en bolus intraveineux suivie d'une perfusion constante sur plusieurs heures (Schaefer *et al.* 1992 ; Ouguerram *et al.* 2002 ; Chan *et al.* 2002). La première méthode permet d'obtenir des courbes cinétiques atteignant un enrichissement maximum suivi d'une phase de décroissance progressive (**Figure 25**). Cette technique est plus simple à réaliser et ne nécessite pas un état stationnaire du pool précurseur, c'est-à-dire de l'espèce moléculaire prise comme référence pour l'évaluation de l'incorporation du traceur au sein des espèces d'intérêts. Cependant, le traceur peut être métabolisé par d'autres voies ou recyclé, après dégradation des espèces à taux de renouvellement rapide, avant même son intégration aux espèces à renouvellement lent (Fisher *et al.* 1997). Cette méthode est donc conseillée pour le marquage de composés rapidement renouvelés. La seconde approche, par perfusion constante, permet aux composés à renouvellement rapide d'atteindre un état d'équilibre, c'est-à-dire un niveau d'enrichissement maximum pour la voie de synthèse étudiée (**Figure 25**) (courbe mono exponentielle). Les composés à renouvellement lent, quant à eux, présenteront des courbes d'enrichissement linéaires dont la pente sera proportionnelle aux taux de catabolisme et de synthèse. Cette méthode permet de minimiser les problèmes de recyclage du traceur et par conséquent les biais mathématiques. Son inconvénient réside dans la courte durée des protocoles (10-15 heures) entraînant une perte dans le niveau d'information recueillie (Barrett *et al.* 1992 ; Foster *et al.* 1993). Des prélèvements sont donc souvent réalisés jusqu'à plusieurs jours après l'arrêt de la perfusion afin d'étudier la disparition du traceur. On parle de protocole à perfusion cassée. Enfin, quel que soit le protocole, les sites de marquage du traceur sont à choisir avec soin afin de perturber le moins possible les réactions biologiques mises en œuvre (voir notion d'effet isotopique) (Barrett *et al.* 2006). D'autres voies d'administration (orale, intrapéritonéale) sont également envisageables chez l'animal, suivant le type de traceurs utilisés et la voie métabolique ciblée (Previs *et al.* 2014).



**Figure 25 :** Cinétiques obtenues pour l'apoB100 (VLDL) et l'apoA-I (HDL) après administration de la  $^2\text{H}_3$ -leucine comme traceur (tracé = leucine) en protocole d'infusion continue (A) ou de bolus (B)

#### 4.2. Choix du traceur endogène

**Les isotopes stables** – Les isotopes stables sont présents à l'état naturel et la plupart du temps en faible quantité par rapport à leurs éléments respectifs (**Tableau 6**) (Schierbeek *et al.* 2012). Les isotopes stables présentent de nombreux avantages pour le marquage *in vivo* lors d'études cinétiques. En effet, si le marquage est localisé de façon réfléchie sur le traceur, sa présence n'altérera pas la structure ou la fonction du composé synthétisé (voire notion d'effet isotopique). De plus, ils ne présentent pas d'appauvrissement spontané au cours du temps et ne posent pas de problème d'ordre éthique chez l'Homme (Schierbeek *et al.* 2012 ; Guerrasio *et al.* 2013). Enfin, grâce au marquage endogène, il est possible de marquer plusieurs espèces

simultanément lors d'un même protocole (Patterson *et al.* 1991 ; Castro-Perez *et al.* 2011 ; Previs *et al.* 2014). Expérimentalement, les isotopes stables diffèrent de leurs éléments respectifs par leur poids moléculaire rendant leur suivi possible par spectrométrie de masse (Tableau 6). Etant présents à l'état naturel, il est conseillé d'enrichir suffisamment le traceur pour obtenir un décalage en masse confortable (supérieur à +2 Th). En effet, toutes les techniques analytiques n'ont pas le même niveau de précision dans la reproductibilité de la mesure du signal isotopique naturel (voir Figure 8). A titre d'exemple et de façon très schématique, une molécule fictive composée uniquement de 25 carbones et de masse M présentera un pic isotopique naturel de type M+1 (appelé M1) d'une intensité d'environ 25 % (abondance d'un  $^{13}\text{C} \sim 1\% \times 25$  carbones) par rapport au pic mono-isotopique M ou M0 (100 %), tandis que le pic naturel M+2 ou M2 (abondance de deux  $^{13}\text{C} \sim 1\% \times 1\% \times 25$  carbones) aura une intensité d'environ 0,0025 %. Les enrichissements étant souvent faibles (0,001-10 %), les valeurs basales mesurées de façon plus ou moins précise peuvent ainsi apporter un biais non négligeable pour la mesure des enrichissements si le traceur utilisé ne présente qu'un décalage en masse de +1 (Stellaard & Lütjohann 2015).

**Tableau 6** : Principaux isotopes des éléments utilisés lors des études cinétiques

Eléments	M0 Abondance (%)	M1 Abondance (%)	M2 Abondance (%)
Carbone (C)	$^{12}\text{C}$ ; 98,93 %	$^{13}\text{C}$ ; 1,07 %	$^{14}\text{C}$ ; radioactif
Hydrogène (H)	$^1\text{H}$ ; 99,99 %	$^2\text{H}$ (ou D, ou <i>d</i> ) ; 0,01 %	$^3\text{H}$ (ou T) ; radioactif
Azote (N)	$^{14}\text{N}$ ; 99,63 %	$^{15}\text{N}$ ; 0,37 %	$^{16}\text{N}$ ; radioactif
Oxygène (O)	$^{16}\text{O}$ ; 99,76 %	$^{17}\text{O}$ ; 0,04 %	$^{18}\text{O}$ ; 0,20 %

**Les types de traceurs** – Tout comme les méthodes de préparation des échantillons, le traceur peut être plus ou moins sélectif. On distingue ainsi les traceurs de type « moléculaire » permettant le suivi d'une classe particulière de composés et les traceurs de type « atomique » permettant un marquage relativement universel. L'avantage des traceurs universels est le haut niveau d'information qu'il est possible de recueillir. L'inconvénient est la mise en œuvre des outils analytiques qui doit prendre en compte différents aspects de la répartition isotopique (voir notion d'isotopologie et d'isotopométrie) (Guerrasio *et al.* 2013). Enfin, le contrôle du

métabolisme parallèle et du recyclage du traceur est plus compliqué dans le cas d'un marquage universel. Le choix du pool précurseur devient dès lors un point crucial de l'analyse. Plusieurs types de marquage, seuls ou en combinaison, peuvent être envisagés suivant le niveau d'information désiré et la compatibilité expérimentale, le type de traceur utilisé influençant souvent le choix de l'outil analytique.

**Marquage des protéines** – Dans le cas des protéines, les traceurs majoritairement employés sont des acides aminés protéinogènes enrichis en isotopes stables, comme par exemple la  $^{15}\text{N}$ -glycine ( $m/z +1$  Th), la  $^{13}\text{C}$ -phénylalanine ( $m/z +1$  Th), la  $^{13}\text{C}$ -leucine ( $m/z +1$  Th), la  $^2\text{H}_3$ -leucine ( $m/z +3$  Th), la  $^2\text{H}_3$ -valine ( $m/z +3$  Th),  $^2\text{H}_2$ - $^{13}\text{C}_2$ -lysine ( $m/z +4$  Th), tous agissent de manière similaire (Cryer *et al.* 1985 ; Lichtenstein *et al.* 1990 ; Schaefer *et al.* 1992). Néanmoins, la leucine présente de nombreux avantages comme traceur de protéines parce qu'elle est un acide aminé essentiel à forte occurrence (7-8 %) et non synthétisée par l'Homme (pas de synthèse endogène), majoritairement catabolisée par le muscle donc présentant un très faible recyclage hépatique, non convertie en un autre acide aminé, et commercialement accessible (Fisher *et al.* 1997 ; Barrett *et al.* 2006). L'avantage du marquage avec plusieurs  $^2\text{H}$  est le décalage en masse confortable pour les analyses par spectrométrie de masse. Cependant, outre leur labilité, les effets isotopiques ne sont pas négligeables avec ce type d'isotope (contrairement aux  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ ) et peuvent entraîner des biais. Leurs positions sur le traceur sont donc primordiales et ne doivent en aucun cas se situer sur les fonctions réactives impliquées dans la liaison peptidique (amine et acide carboxylique).

**Marquage des lipides** – De nombreuses méthodes existent pour le marquage des lipides suivant la nature des espèces que l'on souhaite tracer et le niveau de précision désiré (Previs *et al.* 2014). Ainsi, le cholestérol marqué au  $^{13}\text{C}$  ou au  $^2\text{H}$  peut être utilisé comme traceur exogène pour l'étude de son propre catabolisme ou comme traceur endogène du métabolisme des CE et des acides biliaires (Pont *et al.* 1997). De même, les acides gras à chaînes longues marqués de plusieurs  $^{13}\text{C}$  peuvent être employés pour l'étude cinétique des lipides « branchés » (stérols esters, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides) (Previs *et al.* 2014 ; McLaren *et al.* 2013a ; McLaren *et al.* 2013b) tout comme le glycérol marqué de plusieurs  $^2\text{H}$  peut être utilisé pour les cinétiques des glycérolipides et des glycérophospholipides (Previs *et al.* 2014 ; Qi *et al.* 2012). L'acide acétique marqué au  $^{13}\text{C}$  est souvent employé comme traceur endogène de par sa capacité à se retrouver dans toutes les familles de lipides (voir **Figure 17**) (Schierbeek *et al.* 2012). Notre laboratoire utilise depuis

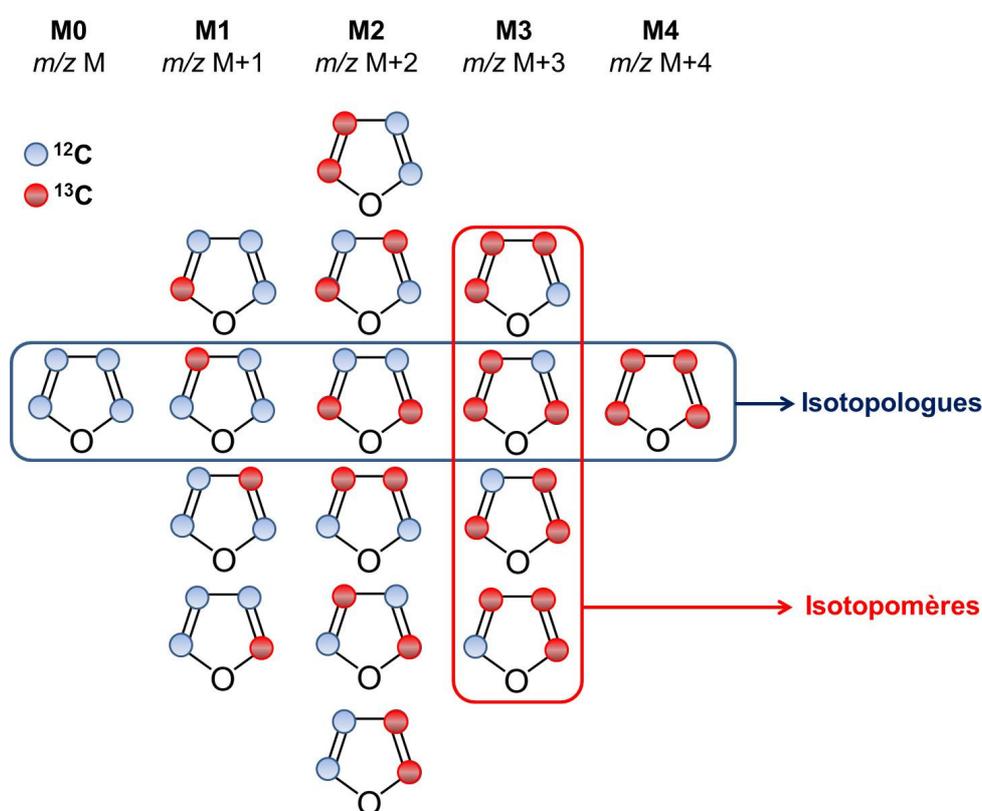
de nombreuses années le  $^{13}\text{C}_2$ -acétate comme traceur endogène pour l'étude des flux de cholestérol et de ses dérivés estérifiés (Ouguerram *et al.* 2002 ; Bailhache *et al.* 2004 ; Ouguerram *et al.* 2004 ; Le Bloc'h *et al.* 2015) mais d'autres laboratoires l'utilisent pour le traçage d'autres lipides tels que les TG (Schierbeek *et al.* 2012). Chacun de ces traceurs présente des avantages et des inconvénients, tant sur le plan physiologique que sur les plans analytique et mathématique (Schierbeek *et al.* 2012 ; Previs *et al.* 2014).

**Marquage universel** – L'eau marquée ( $^2\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) est un excellent traceur universel qui présente de nombreux avantages du fait qu'elle ne perturbe pas l'homéostasie biologique, qu'elle pénètre uniformément dans les tissus et les cellules et qu'elle est facile à administrer par voie orale (eau de boisson) et voie intrapéritonéale (Castro-Perez *et al.* 2011). Ce traceur est aujourd'hui essentiellement utilisé chez l'animal et a montré son efficacité pour les mesures cinétiques de nombreuses espèces moléculaires incluant les protéines, les lipides, les carbohydrates et autres métabolites (Castro-Perez *et al.* 2011 ; Schierbeek *et al.* 2012 ; Zhou *et al.* 2012 ; Conway *et al.* 2012 ; Wilkinson *et al.* 2014 ; Previs *et al.* 2014). Son caractère universel implique une parfaite maîtrise des fragmentations isotopiques au sein des composés étudiés et le choix du pool précurseur devient dès lors difficile (Zhou *et al.* 2012).

### 4.3. Isotopologie, isotopométrie et effet isotopique

**Généralités** – Le principal avantage des traceurs enrichis en isotopes stables est qu'ils sont non radioactifs et présentent peu de risques pour l'Homme. En outre, on suppose que ces traceurs suivent les mêmes voies biochimiques aux mêmes taux que leurs homologues non marqués lorsqu'ils sont étudiés *in vivo* ou *in vitro*. Cette hypothèse implique que les enzymes ne discriminent pas ou ne préfèrent pas un variant isotopique pour les processus biologiques. Le cas échéant, on parle d'effet isotopique (Schierbeek *et al.* 2012 ; Previs *et al.* 2014). Néanmoins, cette non-discrimination supposée dans le cas des processus biologiques est totalement avérée lors des étapes d'extraction et de purification des échantillons. Les composés marqués et leurs homologues non marqués possèdent en effet des propriétés physico-chimiques très proches. Dès lors, l'ensemble de ces composés est extrait de la même façon de l'échantillon biologique, ne sont pas séparables par chromatographie et possèdent les mêmes rendements d'ionisation dans les sources d'ions. C'est d'ailleurs pour ces propriétés que des analogues marqués synthétiquement à l'aide d'isotopes stables sont plébiscités comme standards internes lors des analyses ciblées par spectrométrie de masse (Sargent

2013). C'est uniquement au moment de la séparation des ions par le spectromètre de masse qu'il sera possible de distinguer les composés marqués de leurs homologues non marqués. En effet, les molécules marquées présenteront un décalage en masse représentatif du type de traceur et du type de marquage utilisé. Dans certains cas, lorsque le traceur employé peut s'incorporer sur plusieurs sites, différents composés à niveaux de marquage graduels seront générés (**Figure 26**). Ces composés, de masses différentes, sont appelés isotopologues. Enfin, à chaque niveau d'enrichissement le traceur pourra se positionner à différents emplacements générant ainsi des isotopomères de masses identiques et considérés comme équimolaires (Brunengraber *et al.* 1997 ; Guerrasio *et al.* 2013).



**Figure 26** : Répartition théorique des isotopologues et isotopomères d'un furanne (4 carbones) après un marquage au  $^{13}\text{C}$

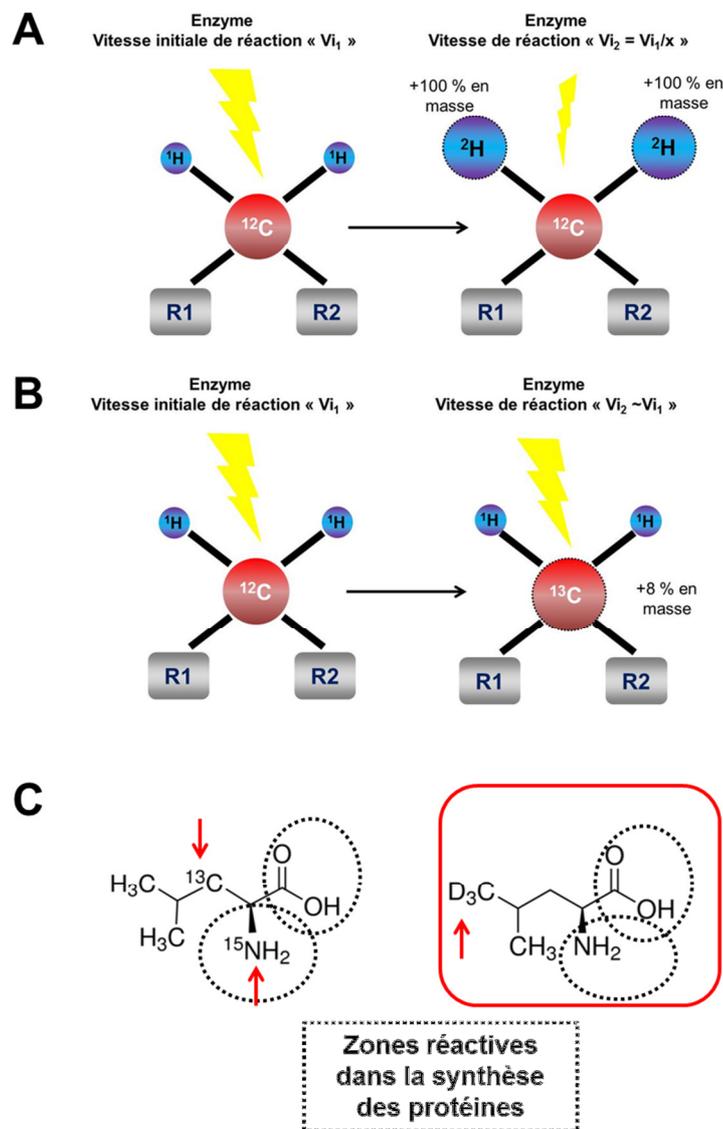
**Les isotopomères** – Pour chaque niveau d'isotopologue, plusieurs isotopomères sont possible. Ces derniers ne sont pas distinguables par spectrométrie de masse car ils possèdent le même poids moléculaire et ne peuvent pas être séparés par chromatographie. Cette répartition isotopomérique est considérée homogène au sein d'un même niveau isotopologique (Brunengraber *et al.* 1997). Le nombre total d'isotopomères, tous niveaux confondus, est donné par la formule  $2^n$  où « n » est le nombre de sites pouvant être marqué

(ex :  $2^4 = 16$  dans notre exemple). La mesure de la distribution isotopomérique est complexe et décrite dans plusieurs revues scientifiques (Brunengraber *et al.* 1997 ; Zamboni 2007 ; Guerrasio *et al.* 2013). Cette notion d'isotopomère peut rendre l'interprétation des analyses par spectrométrie de masse complexe. Aussi, il est préférable de minimiser ce phénomène, soit en réduisant la taille de l'analyte au plus proche de celle du traceur (ex : pour une protéine, analyse des acides aminés après hydrolyse si un acide aminé a été employé comme traceur), soit en utilisant un traceur qui ne pourra s'incorporer que sur un nombre limité de sites, soit en se focalisant sur un même état d'enrichissement pour les analytes ciblés et le ou les pool(s) précurseur(s) choisi(s).

**Les isotopologues** – Contrairement aux isotopomères, les isotopologues sont parfaitement identifiables par spectrométrie de masse à un niveau de précision dépendant du type de marquage et de la résolution du détecteur utilisé. Leur nombre est donné par la formule «  $n + 1$  » où «  $n$  » est le nombre de site pouvant être marqué (ex :  $4 + 1 = 5$  dans notre exemple) (Brunengraber *et al.* 1997). Les isotopes étant présents à l'état naturel et parfois en quantité non négligeable ( $\sim 1 \times x \%$  de  $^{13}\text{C}$  pour  $x$  carbonnes), les abondances des composés de masse  $M$  aux niveaux isotopiques  $M+1$  ( $M1$ ) et  $M+2$  ( $M2$ ) sont importantes et doivent être prises en compte pour l'analyse des données (Brunengraber *et al.* 1997 ; Guerrasio *et al.* 2013). De plus, les détecteurs de basse résolution majoritairement utilisés (Q, IT) ont une précision de mesure d'environ 0,2-0,7 Th ( $m/z$ ), rendant possible les phénomènes de recouvrement entre les pics  $M$  et  $M+1$  et, par conséquent, les biais analytiques. C'est pour cette raison que les traceurs marqués sur plusieurs sites sont plébiscités. A titre d'exemple, la  $^2\text{H}_3$ -leucine donnera trois isotopologues sur un peptide contenant 2 leucines :  $M$  (ou  $M0$ ),  $M+3$  (ou  $M3$ ) et  $M+6$  (ou  $M6$ ). Le décalage en masse confortable ( $+ 3$  car  $3 \times ^2\text{H}$ ) permettra une mesure plus spécifique par spectrométrie de masse (Schierbeek *et al.* 2012 ; Previs *et al.* 2014). Comme pour les isotopomères, l'effet isotopologique peut être minimisé, soit en réduisant la taille de l'analyte au plus proche de celle du traceur, soit en utilisant un traceur qui s'incorporera de façon limitée.

**L'effet isotopique** – Les traceurs sont choisis pour suivre les mêmes voies biochimiques que leurs homologues non marqués lorsqu'ils sont employés à des concentrations physiologiques. Cette hypothèse est vraie si les sites de marquage ne sont pas impliqués directement dans une réaction enzymatique d'intérêt (Schierbeek *et al.* 2012 ; Previs *et al.* 2014). En effet, la vitesse d'une réaction chimique peut être modifiée lorsque l'un des atomes d'un réactif est remplacé par l'un de ses isotopes. Il s'agit de l'effet isotopique (Westaway

2006). De façon très schématique, l'importance des effets isotopiques va de pair avec les changements en masse car les fréquences de vibration moléculaire des liaisons impliquées sont modifiées. Le remplacement d'un atome d'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) par un deutérium ( $^2\text{H}$ ) représente une augmentation en masse de 100 %, tandis que le remplacement d'un carbone 12 ( $^{12}\text{C}$ ) par un carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) n'augmente la masse que de 8 % (7 % pour  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  et 13 % pour  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ ). La vitesse de réaction d'une liaison  $\text{C}-^1\text{H}$  est donc bien plus rapide que celle d'une liaison  $\text{C}-^2\text{H}$ , mais une réaction de  $^{12}\text{C}$  n'est que quelques pour cent plus rapide que celle d'un  $^{13}\text{C}$  (**Figure 27**). L'effet isotopique peut être minimisé, voire annulé, si les sites de marquage du traceur sont choisis avec soin afin de ne pas interférer avec les réactions enzymatiques impliquées dans la voie métabolique d'intérêt (*Barrett et al. 2006*).



**Figure 27** : Illustration de l'effet isotopique avec l'hydrogène (A) ou le carbone (B) et importance du choix du traceur (cas de la leucine) (C).

#### 4.4. Mesure des enrichissements

L'analyse spécifique par spectrométrie de masse détermine l'apparition des divers isotopologues d'une molécule cible suivant l'outil analytique employé. La zone de pic chromatographique de chaque isotopologue, cumulant les signaux de chaque isotopomère, est intégrée et utilisée pour calculer le rapport entre le fragment de composé marqué et son homologue non marqué, ce que l'on appelle usuellement le rapport traceur/tracé (TTR, *tracer-to-tracee ratio*) ou encore l'enrichissement relatif. Cet enrichissement relatif doit être corrigé par le nombre d'isotopomères générés au niveau isotopologique étudié (Brunengraber *et al.* 1997 ; Schierbeek *et al.* 2012).

$$\text{TTR} = \frac{M_x}{M_0 \times n}$$

$x$  : gain en rapport  $m/z$  (isotopologue) ;  $n$  = nombre d'isotopomères

Parce que les isotopes stables sont également présents naturellement, le TTR doit être mesuré en l'absence de traceur (temps 0). Au cours des expériences, l'enrichissement absolu (TTR<sub>a</sub>) est obtenu en soustrayant la valeur de l'échantillon enrichi naturellement (TTR<sub>t0</sub>) de l'échantillon enrichi au cours de l'expérience (TTR<sub>tx</sub>). Cette correction est particulièrement importante pour les isotopologues de type M+1 (Brunengraber *et al.* 1997 ; Schierbeek *et al.* 2012).

$$\text{TTR}(a) = \text{TTR}(tx) - \text{TTR}(t0)$$

Les enrichissements isotopiques peuvent ensuite être convertis en MPE (*mol percent excess*) de la façon suivante :

$$\text{MPE} (\%) = \frac{\text{TTR}(a)}{(1 + \text{TTR}(a))} \times 100$$

Pour les analyses obtenues par IRMS (échelle atomique), l'unité standard utilisé est l'APE (*atom percent excess*). Cette unité se base sur une valeur de référence d'enrichissement pour l'élément utilisé (C, H, N, O). Dans le cas d'un enrichissement au carbone, l'APE est ainsi défini par l'équation suivante :

$$\text{APE (\%)} = \left[ \frac{100 \times R \times \left( \frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right)}{1 + R \times \left( \frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right)} \right]_{\text{tx}} - \left[ \frac{100 \times R \times \left( \frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right)}{1 + R \times \left( \frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right)} \right]_{\text{t0}}$$

$\delta^{13}\text{C}$  (‰) =  $[(R_s/R_{st}) - 1] \times 1000$ , avec  $R_s$  le rapport d'abondance  $^{13}\text{C}$  dans l'échantillon et  $R_{st}$  le rapport d'abondance  $^{13}\text{C}$  dans la référence.

$R$  est le rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la référence standard ( $R = 0,0112372$ , Vienna Pee Dee Belemnite ou VPDB)

L'APE peut ensuite être corrigé par le nombre de carbones afin d'être converti en MPE :

$$\text{APE}_c = \text{APE} - C_{\text{total}}/C_{\text{marqué}}$$

$$\text{MPE (\%)} = \frac{\text{APE}_c}{(100 + \text{APE}_c)} \times 100$$

Les valeurs MPE et APE sont considérées comme plus fiables pour les calculs mathématiques et la modélisation cinétique, que les valeurs d'enrichissements isotopiques (TTR) (Schierbeek *et al.* 2012). Cependant, suivant l'appareillage utilisé pour l'analyse, le type de traceur et le niveau de marquage, les valeurs TTR restent plus simples à obtenir. Comme le principal objectif des analyses de flux réside dans la comparaison des dynamiques entre deux états physiologiques (état A *versus* état B), il est surtout nécessaire d'employer la même méthodologie pour l'ensemble des composés étudiés ainsi que pour les composés de substitution utilisés comme références (pool précurseur).

#### 4.5. Analyses cinétiques et modélisation

**Généralités** – La mesure des enrichissements au cours du temps permet de tracer des courbes cinétiques analysables mathématiquement afin d'en extrapoler les informations métaboliques pertinentes. Il s'agit de l'étape de modélisation. Il est donc nécessaire de définir un modèle mathématique permettant de se rapprocher au maximum de la réalité physiologique, tout en gardant à l'esprit qu'il vaut mieux procéder à une analyse mathématique primaire que d'utiliser une modélisation complexe erronée. En effet, le modèle mathématique peut être plus ou moins élaboré suivant le niveau de connaissance du composé ciblé et suivant les données expérimentales disponibles. On distingue ainsi les modèles simples à un seul compartiment, contenant une entrée et une sortie, et les modèles complexes caractérisés par plusieurs compartiments reliés par différents processus d'échanges. Dans le

cas où le niveau de connaissance physiologique d'un composé est peu élevé, il est également possible d'utiliser des modèles mathématiques non-compartmentés. Pour étudier et modéliser le métabolisme d'un composé, il est donc important de bien choisir le traceur, les fractions et sous-fractions plasmatiques à analyser afin de définir le modèle, et le pool précurseur le plus représentatif (Barrett *et al.* 2006).

**Définitions** – Les principaux paramètres cinétiques sont les suivants (**Figure 28**).

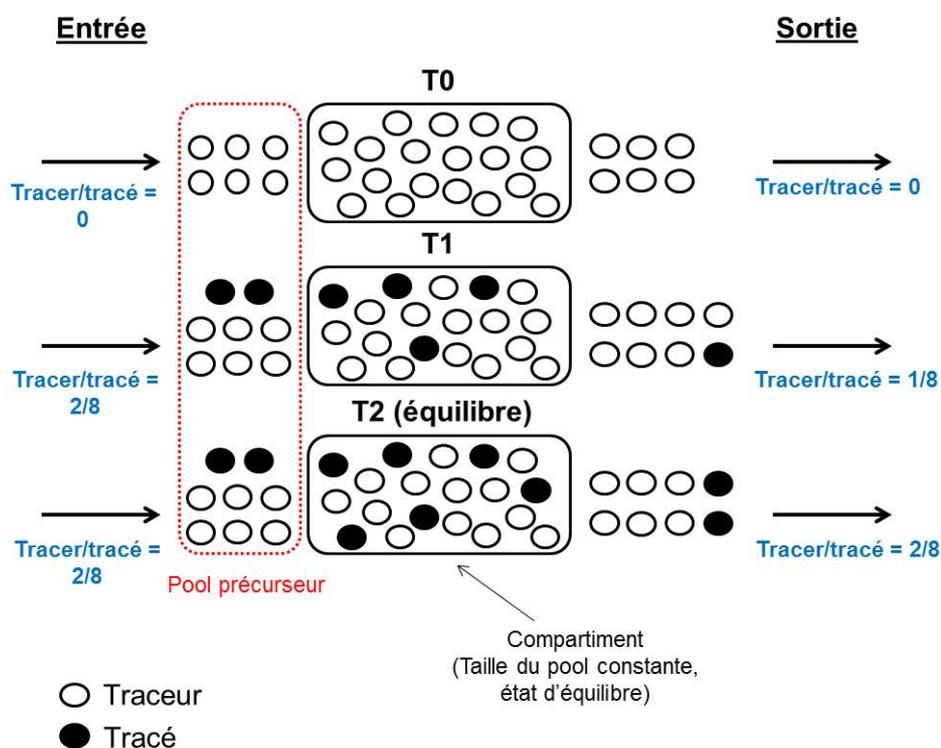
Le pool précurseur (*precursor pool*) permet d'évaluer l'utilisation du traceur dans la voie métabolique d'intérêt. L'enrichissement élémentaire du traceur peut être utilisé comme référence à condition de prendre en compte son métabolisme et son recyclage. Il est parfois plus aisé d'utiliser un composé de substitution synthétisé rapidement. Par exemple, dans le cas des apolipoprotéines, le plateau asymptotique d'enrichissement de l'apoB100 des VLDL peut être utilisé comme valeur de référence ou comme enrichissement maximum atteignable par toute autre apolipoprotéine majoritairement synthétisée par le foie (voir **Figure 25**). Plus généralement, dans le cas des protéines étudiées *via* la leucine marquée, il est également possible de mesurer l'enrichissement plasmatique de l'acide  $\alpha$ -cetoisocaproïque (KIC, analogue dérivé de la leucine par transamination). En effet, l'enrichissement du KIC est considéré à l'équilibre avec l'enrichissement de la leucine intracellulaire, mais sans être spécifique d'un organe.

La taille du pool (*pool size*) correspond à la quantité de composé présent dans un compartiment. Le pool est exprimé en « g » ou « mol » et dépend donc de la masse corporelle de l'individu et de son volume sanguin. Chez l'Homme, le volume plasmatique est considéré comme égal à 4,5 % de la masse corporelle. A titre d'exemple, la taille du pool (en g) est le produit de la concentration (g/L) par le poids (kg)  $\times 0,045$  (L/kg).

Le taux de catabolisme fractionné ou FCR (*fractional catabolic rate*) correspond à la proportion de la masse d'un compartiment qui est renouvelé par unité de temps (pool/jour). Si l'état d'équilibre est avéré (pas de variation de la taille du pool au cours du temps), le FCR est égal au taux de synthèse fractionné ou FSR (*fractional synthetic rate*). De façon schématique, les flux d'entrées et les flux de sorties sont égaux au sein du compartiment à l'équilibre.

Le temps de résidence (RT, *residence time*) d'une particule dans un compartiment est exprimé en unité de temps et correspond à l'inverse du FCR.

Le taux de production absolue (APR, *absolute production rate* ou PR, *production rate*) correspond à la quantité de pool renouvelée par unité de temps (exprimé en g/kg/jour) et est le produit du FSR (pool/jour) par la taille du pool (g/L)  $\times 0,045$  (L/kg).



**Figure 28** : Représentation schématique de la notion de compartiment

(adapté de Schierbeek *et al.* 2012)

**Modèles non-compartimentés et fonctions algébriques** – Les paramètres cinétiques peuvent être estimés en utilisant l'approche non-compartimentée. Les formules algébriques utilisées reposent sur le fait que le système étudié est à l'état stationnaire et que les pools précurseurs sont cinétiquement homogènes. Pour un grand nombre de composés cette hypothèse n'est pas valide (Foster *et al.* 1993 ; Barrett & Foster 1998). Ainsi, les formules estimant le FSR ne sont pas totalement fiables (Barrett *et al.* 2006). Néanmoins, ces méthodes permettent d'établir une première approche dans le cas où les mécanismes physiologiques ne sont pas ou mal connus. De façon générale, le FSR peut être calculé selon deux méthodes non-compartimentées définies en fonction de la conception de l'étude et de la propriété dynamique du composé. Si le renouvellement est rapide, il est possible de modéliser

directement le taux d'enrichissement du composé du fait qu'il s'approche de l'enrichissement d'équilibre (enrichissement asymptotique) (Zhou *et al.* 2013 ; Xie *et al.* 2016).

$$y(t) = P \times (1 - e^{-FSR \times (t-d)}) \rightarrow \text{équation mono-exponentielle}$$

*y est le niveau d'enrichissement au cours du temps, P est le plateau asymptotique d'enrichissement, t est le temps et d est le délai de synthèse.*

L'autre approche est utilisée pour les composés à renouvellement lent n'atteignant pas l'état d'équilibre. Dans ce cas, le FSR est défini par l'équation suivante:

$$FSR = \text{variation de l'enrichissement} / \text{enrichissement du précurseur}$$

Diverses valeurs peuvent être utilisées pour le terme « enrichissement du précurseur » (Frischmann *et al.* 2007), comme le rapport traceur sur tracé. Cependant, cette valeur peut entraîner de sérieux biais, car le traceur n'est probablement pas entièrement utilisé durant la phase d'étude. L'autre stratégie consiste donc à utiliser un composé de substitution, proche mais à renouvellement rapide, pour représenter le véritable enrichissement intracellulaire de la voie métabolique considérée. Le terme « variation de l'enrichissement » est souvent déterminé par une régression linéaire de la phase croissante de la courbe (pente) (Zhou *et al.* 2013 ; Xie *et al.* 2016). Si la concentration du composé est constante durant la phase d'étude, le FSR est considéré comme égal au FCR et l'APR peut être calculé comme décrit précédemment. Enfin, dans le cas où un grand nombre de données ont pu être collectées, une modélisation compartimentée peut être envisagée (Barrett *et al.* 2006).

**Modèles compartimentés** – Les modèles à compartiments constituent la méthode de choix pour la modélisation cinétique des constituants des lipoprotéines. Un avantage majeur de ces modèles par rapport aux autres méthodes est leur capacité à prendre en compte l'hétérogénéité cinétique du métabolisme des lipoprotéines et des individus. Le modèle a pour objectif l'intégration d'un système subdivisé en compartiments ayant de nombreuses interconnexions. Chaque compartiment correspond à un sous-ensemble d'éléments ayant un comportement analogue et possédant une homogénéité cinétique. Chaque compartiment peut réaliser des échanges avec d'autres compartiments ou avec le milieu extérieur. Ces échanges correspondent à des processus physiologiques et sont définis par des flux exprimés en quantité de matière par unité de temps. Ces flux peuvent modifier la taille des compartiments en fonction des entrées et des sorties subies. Il est alors possible d'associer des équations différentielles au modèle afin de tenir compte du bilan massique. A l'état d'équilibre, la

somme des flux entrant dans le système est égale à la somme des flux qui en sortent. Les masses de tous les compartiments sont alors constantes, ainsi que les flux massiques de l'ensemble des processus. Les coefficients de transfert entre compartiments peuvent ainsi être calculés et les paramètres cinétiques peuvent être évalués pour un ensemble de compartiments (Barrett *et al.* 2006). Le taux de renouvellement de cet ensemble sera ainsi obtenu par le rapport des flux sortants de l'ensemble sur la masse totale des compartiments :

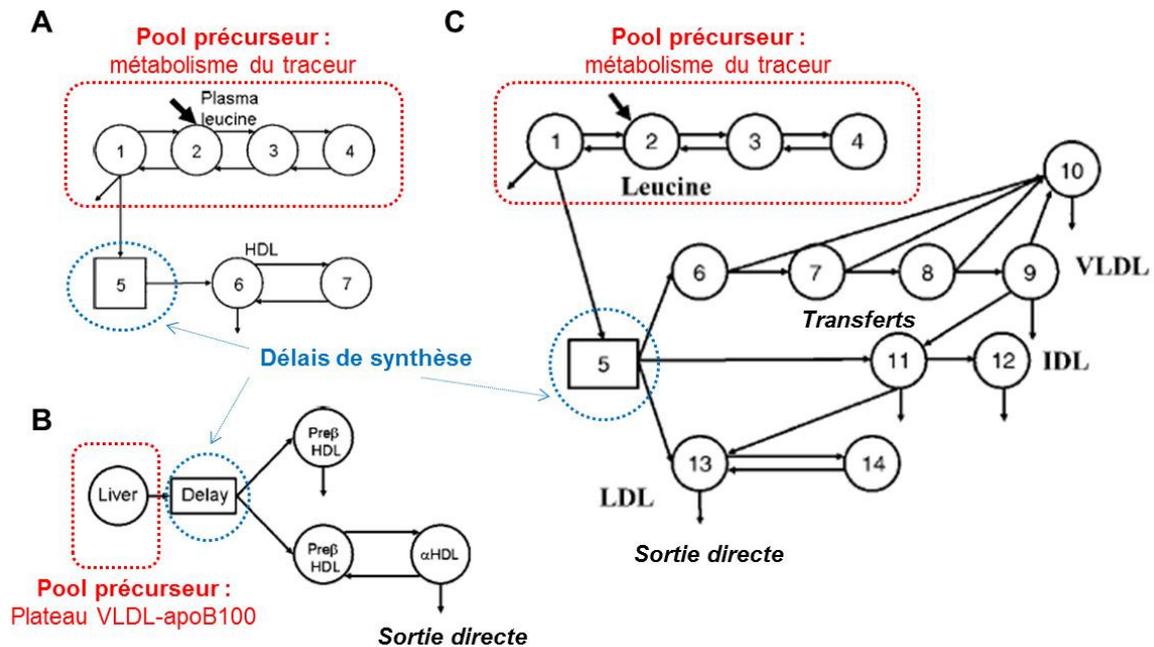
$$\text{FCR} = \frac{k_1 \times Q_1 + k_2 \times Q_2}{(Q_1 + Q_2)}$$

*Q<sub>x</sub> est la masse d'un compartiment x et k<sub>x</sub> le taux de transfert qui lui est associé*

Comme la plupart des études cinétiques des lipoprotéines sont effectuées à l'état stationnaire (à jeun), le FCR est considéré égal au FSR et l'APR est calculé comme décrit précédemment. Les études cinétiques peuvent aussi être modélisées dans des conditions non stables, mais cela nécessite certaines hypothèses complexes sur les taux de production et/ou de catabolisme (Parhofer *et al.* 1999 ; Barrett *et al.* 2006). Le développement des modèles à compartiments demeure long et complexe car le modèle doit refléter les flux mesurés sur un ensemble d'individus (Barrett *et al.* 2006). Ces développements nécessitent l'acquisition d'un très grand nombre de données, l'utilisation de logiciels appropriés (Barrett *et al.* 1998) et des connaissances approfondies dans la physiologie des espèces d'intérêt et dans la modélisation (Figure 29).

**Validation du modèle** – Le développement d'un modèle nécessite d'évaluer sa viabilité et sa précision (identifiabilité). Si le modèle est utilisé comme outil d'investigation, l'analyse de l'identifiabilité n'est cependant pas primordiale (Cobelli *et al.* 1979). Cette étape doit avoir lieu avant les expériences (*a priori*) en définissant les paramètres nécessaires à l'élaboration du modèle, puis après l'ajustement du modèle aux données expérimentales (*a posteriori*). Cette identifiabilité *a posteriori* définit la capacité du modèle à décrire les données expérimentales dont il est nécessaire d'apprécier les erreurs inhérentes. Le logiciel SAAM II (*Simulation, Analysis, and Modeling*) est particulièrement adapté aux analyses cinétiques. Il permet la création du modèle, la visualisation des courbes cinétiques et l'estimation de divers paramètres mathématiques (déviations standards, variance, coefficients de variation...) nécessaires aux ajustements à appliquer au modèle (Barrett *et al.* 1998). Enfin, ce processus de validation reste quelque peu subjectif car il s'appuie également sur l'intuition, la connaissance du système et l'expérience de l'expérimentateur pour évaluer si oui ou non le

modèle est adéquat (Barrett *et al.* 2006). Une grande variété de critères doit être considérée, en particulier la robustesse et la répétabilité. D'un point de vue scientifique, la validité d'un modèle peut également être mesurée par sa simplicité, sa cohésion avec les données expérimentales, son potentiel explicatif et son utilité. Au-delà des tests mathématiques, la cohésion et l'utilité sont des dimensions particulièrement importantes pour évaluer la validité d'un modèle (Barrett *et al.* 2006).



**Figure 29 :** Quelques exemples de modèles à plusieurs compartiments décrivant les cinétiques de l'apoA-I des HDL (A), (B) (Barrett *et al.* 2006; Chétiveaux *et al.* 2004) et le métabolisme de l'apoB100 des VLDL, IDL et LDL (C) (Watts *et al.* 2003).

## 5. APPORTS METHODOLOGIQUES

### 5.1. Marqueurs conventionnels du métabolisme des lipoprotéines et méthodes empiriques de mesure

**Les lipides** – Les marqueurs classiques du métabolisme des lipoprotéines sont les TG plasmatiques, le cholestérol total (CL + CE) et plus rarement les PL ([Dominiczak & Caslake 2011](#)). Le cholestérol total est mesuré dans le plasma (CT) ([Dominiczak 2000](#)) ou dans les fractions LDL et HDL (LDL-C, HDL-C). Les mesures HDL-C et CT permettent de calculer le rapport CT/HDL-C censé représenter l'équilibre dans le transport du cholestérol. La mesure des TG plasmatiques reflète la concentration des VLDL et IDL (à jeun), ainsi que des CM et CM remnants (postprandial). Dans la pratique courante, les mesures de CT, de HDL-C et de TG permettent le calcul de LDL-C par la formule de Friedewald ([Friedewald et al. 1972](#)) :

$$\text{LDL-C (mmol/L)} = \text{CT} - \text{HDL-C} - (\text{TG}/2,2)$$

Dans ce cas, le LDL-C inclut également l'IDL-C mais aussi le Lp(a)-C. La formule de Friedewald n'est pas applicable aux patients présentant des TG en concentrations très basses ou supérieures à 4,5 mmol/L. Malgré ces limitations, la formule a été couramment utilisée pour l'évaluation du risque cardiovasculaire et en particulier pour le suivi des traitements hypolipidémisants. Un paramètre plus récent a par ailleurs vu le jour : le non-HDL cholestérol (non-HDL-C), calculé de la manière suivante :

$$\text{Non-HDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C}$$

Comparé au LDL-C, le non-HDL-C semble être un meilleur prédicteur des maladies coronariennes. Le non-HDL-C est une estimation simple du cholestérol athérogène contenu dans les VLDL, les IDL, les LDL et la Lp(a) ([Shai et al. 2004](#) ; [Jiang et al. 2004](#) ; [Liu et al. 2006](#)). De façon générale, les TG, CT et PL contenus dans le plasma ou les fractions lipoprotéiques sont mesurés à l'aide de kits colorimétriques commerciaux. La méthode historique de mesure des lipides et des lipoprotéines implique l'ultracentrifugation pour séparer partiellement les lipoprotéines ([Hainline et al. 1983](#)). Après élimination des VLDL et des CM, les lipoprotéines contenant de l'apoB100 sont généralement précipitées à l'aide d'héparine et de chlorure de manganèse, laissant les HDL en solution pour la mesure du HDL-C. Le LDL-C est ensuite calculé comme suit et comprend donc également l'IDL-C et le Lp(a)-C :

$$\text{LDL-C} = \text{CT} - \text{VLDL-C} - \text{HDL-C}$$

**Les apolipoprotéines** – Les deux principales apolipoprotéines utilisées comme marqueur du métabolisme des lipoprotéines sont sans conteste l'apoB100 et l'apoA-I. Elles sont en effet positivement (apoB100) et négativement (apoA-I) associées au surrisque cardiovasculaire (Andrikoula & McDowell 2008). Le rapport apoB100/apoA-I est souvent interprété de la même manière que le rapport CT/HDL-C et reflète l'équilibre entre les lipoprotéines potentiellement athérogènes [VLDL, IDL, LDL, Lp(a)] et l'effet antiathérogène des HDL (Thompson & Danesh 2006). Le rapport apoB100/apoA-I est considéré comme plus prédictif du risque cardiovasculaire que le rapport CT/HDL-C (Dominiczak & Caslake 2011), et peut être utilisé pour le diagnostic des dyslipidémies. A l'instar de la mesure des TG non à jeun, l'analyse de l'apoB48 reflète l'état de la lipémie postprandiale. L'apoB48 est donc un marqueur de choix pour l'étude du métabolisme postprandial et de son incidence sur le risque cardiovasculaire (Karpe 1999 ; Smith *et al.* 1999). L'apoC-III présente également un grand intérêt pour prédire le risque cardiovasculaire, notamment lorsqu'elle est dosée dans les fractions HDL et non-HDL (Chan *et al.* 2008). L'apoE est aussi une apolipoprotéine d'intérêt dans l'étude des dyslipidémies. Plus que sa concentration plasmatique ou lipoprotéique, c'est le polymorphisme génétique de l'apoE (isoformes E2, E3 et E4) qui est à l'origine de la plupart des dérèglements métaboliques (Kypreos *et al.* 2009). Enfin, la Lp(a) est un marqueur de risque cardiovasculaire d'importance dont les concentrations sont essentiellement déterminées génétiquement (Kronenberg & Utermann 2013). La taille polymorphique de l'apo(a) constitue un élément clé pour la précision des analyses. A noter également qu'une grande confusion persiste sur la mesure de la Lp(a) plasmatique. En effet, les dosages tendent à exprimer une mesure directe de la particule Lp(a) ce qui ne tient pas compte des variations possibles de son contenu lipidique ni de la taille très variable de l'apo(a) (McConnell *et al.* 2014).

Avec l'émergence de l'automatisation et les progrès dans la production d'anticorps spécifiques et monoclonaux, les techniques utilisées aujourd'hui pour le dosage de l'apoB100 et de l'apoA-I comprennent les tests immuno-enzymatiques (ELISA), l'immuno-néphélométrie et l'immuno-turbidimétrie. De façon analogue, les apoA-II, apoC-II, apoC-III et apoE sont principalement dosées par ELISA (voire immuno-néphélométrie et immuno-turbidimétrie). Néanmoins, ces protéines sont principalement analysées à des fins de recherche (Dominiczak & Caslake 2011). Concernant l'apoE, la détection de ses isoformes a longtemps été réalisée sur gel (Siest *et al.* 1995). Cependant, des facteurs tels que les

modifications post-traductionnelles peuvent affecter les résultats de ce phénotypage. Aujourd'hui, la majorité des laboratoires utilise la PCR (*polymerase chain reaction*) et l'électrophorèse capillaire (Hixson & Vernier 1990 ; Siest *et al.* 2000). L'apoB48, quant à elle, est plus difficile à analyser en raison de la courte durée de vie des CM. Cette dernière peut être mesurée par SDS-PAGE et ELISA sur plasma total ou après isolement des CM par ultracentrifugation, mais ces méthodes sont complexes et/ou fort coûteuses (Karpe & Hamsten 1994). Il est important de noter que les concentrations en apolipoprotéines sont particulièrement intéressantes lorsqu'elles sont mesurées dans les fractions lipoprotéiques, car elles sont plus prédictives du risque cardiovasculaire que les concentrations plasmatiques totales. C'est notamment le cas des apoC-III et apoE (HDL et VLDL) (Chivot *et al.* 1990 ; Luc *et al.* 1996 ; Sacks *et al.* 2000). Néanmoins, l'isolement des fractions lipoprotéiques est majoritairement réalisé par ultracentrifugation où des problèmes de récupération sont souvent observés pour les apolipoprotéines échangeables (apoC, apoE). Une alternative consiste à isoler les fractions par FPLC, mais cette méthode entraîne une très forte dilution de l'échantillon (Batal *et al.* 2000). Enfin, pour la Lp(a), les variations polymorphiques de l'apo(a) compliquent sa mesure par ELISA (Marcovina *et al.* 2000). Par conséquent, les kits de dosage commerciaux peuvent sous-estimer ou surestimer la quantité de Lp(a) circulante (Danik *et al.* 2006).

## 5.2. Analyses des apolipoprotéines par spectrométrie de masse

**Analyse quantitative** – Les concentrations en apolipoprotéines sont majoritairement mesurées par ELISA, dans le plasma ou les fractions lipoprotéiques préalablement isolées par ultracentrifugation ou FPLC (Dominiczak & Caslake 2011). Cependant, les kits de dosage ne permettent d'étudier qu'une apolipoprotéine à la fois. Pour des raisons de coûts et de faisabilité expérimentale, la plupart des laboratoires de recherche ne se sont donc intéressés qu'aux apolipoprotéines majeures telles que les apoA-I, apoB100 apoC-III et apoE, et, dans une moindre mesure, les apoA-II, apoB48, apoC-II et Lp(a). Bien que très fiables, ces tests ELISA peuvent présenter divers problèmes de spécificité lorsque la protéine d'intérêt est sujette aux variations polymorphiques ou post-traductionnelles (Dominiczak & Caslake 2011).

Certains laboratoires ont également développé des techniques à base de GC-MS pour la quantification de certaines apolipoprotéines (Beghin *et al.* 2000). Le principe réside dans

l'isolement spécifique des apolipoprotéines par précipitation sélective ou électrophorèse. Le précipité ou la bande de gel excisée contenant la protéine est ensuite soumis(e) à une puissante hydrolyse acide (6 N, 110 °C, 24 h) afin de cliver les liaisons peptidiques. Les acides aminés libérés sont ensuite purifiés par extraction en phases solide/liquide, puis dérivés pour l'analyse par GC-MS (voire LC-MS/MS). La quantification d'un ou de plusieurs acides aminés spécifiques, dont le nombre de répétition dans la séquence protéique est connu, est alors réalisée. Les lois de la Stœchiométrie permettent ainsi de déduire la concentration molaire de la protéine. Cette technique est fastidieuse (**Figure 30**) et peut être sujette à plusieurs difficultés expérimentales, comme la stabilité des acides aminés au cours de l'expérience, les modifications polymorphiques des protéines entre individus, le mauvais isolement de la protéine au départ (contamination par d'autres protéines ou acides aminés)... Cette méthode a pour principal avantage de pouvoir être réalisée en parallèle des mesures d'enrichissement de certaines apolipoprotéines (Beghin *et al.* 2000).

Depuis le début des années 2010, grâce aux avancées dans le séquençage des protéines et aux évolutions technologiques, de nouvelles méthodologies analytiques, plus douces, plus rapides et plus sensibles, ont vu le jour (Lassmann *et al.* 2012 ; Ceglarek *et al.* 2013 ; Pan *et al.* 2014 ; Abbatiello *et al.* 2015). Leur principe est basé sur l'hydrolyse enzymatique (protéolyse) des protéines, générant plusieurs peptides plus ou moins spécifiques. L'extraction et la détection d'un peptide signature (protéotypique) de la protéine d'intérêt sont ensuite réalisées par LC-ESI-MS/MS (**Figure 30**). Le mode MS/MS (MRM) garantit l'intégrité de la séquence, et la quantification est possible *via* des solutions étalons de peptides synthétiques ou de protéines recombinantes. Le choix du peptide signature est primordial. Il doit être stable, contenir suffisamment d'acides aminés pour garantir sa spécificité et présenter les meilleurs conditions analytiques possibles. Comme pour la méthode par GC-MS, il est nécessaire de connaître l'occurrence du peptide au sein de la séquence protéique afin d'utiliser les règles de Stœchiométrie pour en déduire la concentration molaire de la protéine. Cette technique présente de nombreux avantages. Elle est rapide, fiable si correctement validée, et permet l'analyse simultanée de plusieurs protéines (Ceglarek *et al.* 2013 ; Pan *et al.* 2014 ; Percy *et al.* 2014 ; Abbatiello *et al.* 2015). Enfin, utilisée à bon escient, cette méthode peut être utilisée pour les mesures d'enrichissements (Lee *et al.* 2012 ; Zhou *et al.* 2013 ; Pan *et al.* 2014) et pour l'étude de certains polymorphismes ou modifications post-traductionnelles (Jian *et al.* 2013 ; Martínez-Morillo *et al.* 2014 ; Lassman *et al.* 2014). Cette méthode peut être appliquée directement sur plasma/sérum ou sur les fractions lipoprotéiques. Sa principale

limite concerne l'analyse des protéines très faiblement concentrées (< 10-25 nmol/L) pour lesquelles le signal est souvent masqué par les protéines abondantes (> 10 µmol/L). Ce problème peut être contourné en réalisant une immuno-capture spécifique ou une déplétion des protéines interférentes avant l'étape de protéolyse (Gauthier *et al.* 2015 ; Xie *et al.* 2016).

**Mesure des enrichissements** – Depuis l'intégration des traceurs enrichis en isotopes stables dans les études cinétiques, les mesures d'enrichissements ont été réalisées par la méthode GC-MS décrite ci-dessus. A titre d'exemple, pour les études utilisant la  $^2\text{H}_3$ -Leucine comme traceur, le traceur ( $^2\text{H}_3$ -leucine) et le tracé (leucine) sont les acides aminés analysés par GC-MS après hydrolyse acide des protéines préalablement isolées par électrophorèse (**Figure 30**). La norleucine, isomère non-protéino-gène de la leucine, est utilisée dans ce cas comme standard interne pour la quantification (Maugeais *et al.* 1996 ; Beghin *et al.* 2000 ; Chétiveaux *et al.* 2004 ; Barrett *et al.* 2006). Depuis peu, les méthodes combinant la protéolyse enzymatique et l'analyse successive de peptides signatures par LC-MS/MS ont révolutionné ce genre d'analyse (Lee *et al.* 2012 ; Zhou *et al.* 2013 ; Pan *et al.* 2014). En effet, cette méthodologie permet de suivre plusieurs protéines en simultanément tout en rendant possible leur quantification en une unique injection (**Figure 30**). Le point crucial réside toujours dans le choix du peptide signature qui doit contenir le traceur au sein de sa séquence. Toujours à titre d'exemple, pour les études utilisant la  $^2\text{H}_3$ -Leucine comme traceur, le peptide signature doit contenir au moins une leucine. Le peptide enrichi (M3, ou M+3) est analysé simultanément au peptide naturel (M0, non enrichi). Ce même peptide, mais marqué synthétiquement avec d'autres isotopes (généralement M+6, M+8 ou M+10), est utilisé comme standard interne pour la quantification. Dans la plupart des cas, les peptides signatures présentent un nombre limité de leucines (1 à 2 généralement, jusqu'à 4). De par la dilution moyenne des leucines au sein des séquences protéiques (~ 7 %), les isotopologues peptidiques de type M6 (M+6, 2 traceurs), M9 (M+9, 3 traceurs) et M12 (M+12, 4 traceurs) ne sont généralement pas détectés. L'isotopologue de référence est donc le M3 (M+3, 1 traceur) et les enrichissements mesurés pour les peptides contenant plusieurs leucines doivent être corrigés par le nombre d'isotopomères possibles, soit le nombre de leucines du peptide (Zhou *et al.* 2013 ; Xie *et al.* 2016).

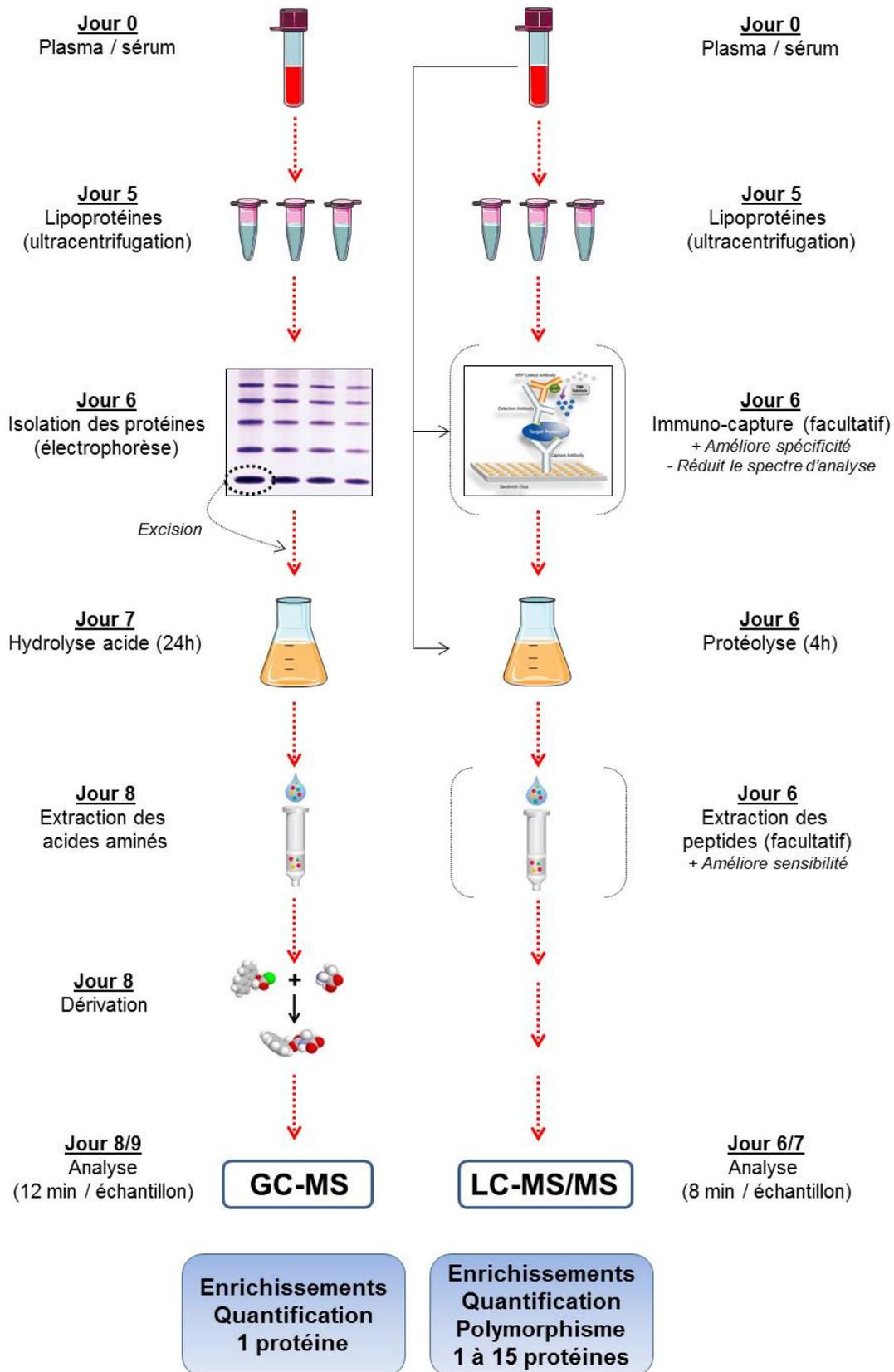


Figure 30 : Comparaison des approches méthodologiques utilisées pour l'analyse des apolipoprotéines

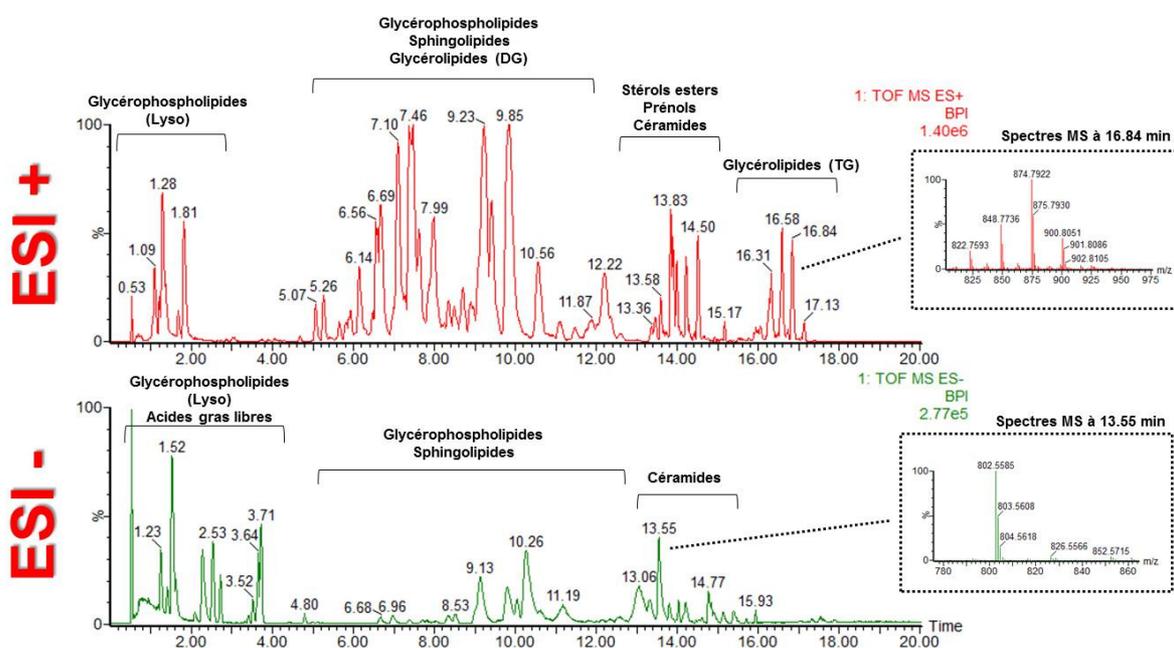
**Polymorphisme et modifications post-traductionnelles** – Comme décrit précédemment, les variations séquentielles inhérentes aux protéines ont majoritairement été étudiées par des techniques de biologie moléculaire. Les nouvelles méthodes impliquant la LC-MS/MS se sont avérées efficaces dans ce domaine, tant sur l'étude des modifications post-traductionnelles, comme la glycosylation (Jian *et al.* 2013), que sur les polymorphismes génétiquement contrôlés, comme la taille de l'apo(a) (Lassman *et al.* 2014) ou les variations séquentielles que l'on peut trouver pour des protéines telles que l'apoE et PCSK9 (Martínez-Morillo *et al.* 2014 ; Gauthier *et al.* 2015). Ces études peuvent être qualitatives ou quantitatives et reposent également sur le choix du peptide signature.

### 5.3. Analyses des lipides par spectrométrie de masse

**Analyse quantitative** – Les lipides peuvent être quantifiés dans les échantillons biologiques (plasma, lipoprotéines isolées par ultracentrifugations ou FPLC) *via* des kits colorimétriques/enzymatiques. Ces méthodes ont beaucoup été utilisées par le passé et le sont toujours comme outil de diagnostic clinique. Elles ont l'avantage d'être fiables et reproductibles, mais ne permettent qu'une quantification générale des lipides par famille (CT, CL, TG, DG, AG, PL) (Dominiczak & Caslake 2011). Aujourd'hui, de nombreuses méthodes basées sur la spectrométrie de masse ont été développées par les laboratoires de recherche pour l'analyse et la quantification des lipides (Quehenberger *et al.* 2010 ; Lam & Shui 2013 ; Han 2016). Les techniques d'extraction en phases liquide/liquide et solide/liquide permettent l'extraction globale ou spécifique des lipides (Löfgren *et al.* 2012 ; Pati *et al.* 2016). Certaines classes de lipides, comme les stérols et les acides gras, sont préférentiellement analysées par GC-MS à cause des mauvais rendements d'ionisation obtenus par ESI (LC-MS/MS) ou à cause des difficultés rencontrées en LC pour la séparation des isomères (Penttilä I *et al.* 1984 ; Pont *et al.* 1997). Il est cependant nécessaire de dériver au préalable les lipides avant l'analyse par GC-MS. Les méthodes à base de GC-MS sont par conséquent très ciblées mais parfois, paradoxalement, très globales. En effet, à titre d'exemple, il n'est pas possible d'analyser directement les stérols estérifiés car il est nécessaire de libérer la fonction alcool pour la dérivation (saponification). Les esters de stérols étant néanmoins isolables des stérols libres, il est donc possible d'évaluer leur quantité totale par GC-MS après hydrolyse et quantification du noyau stérolique. Aucune information n'est alors disponible sur le type d'acide gras initialement branché (Griffiths *et al.* 2017). Aujourd'hui, de nombreuses méthodes basées sur

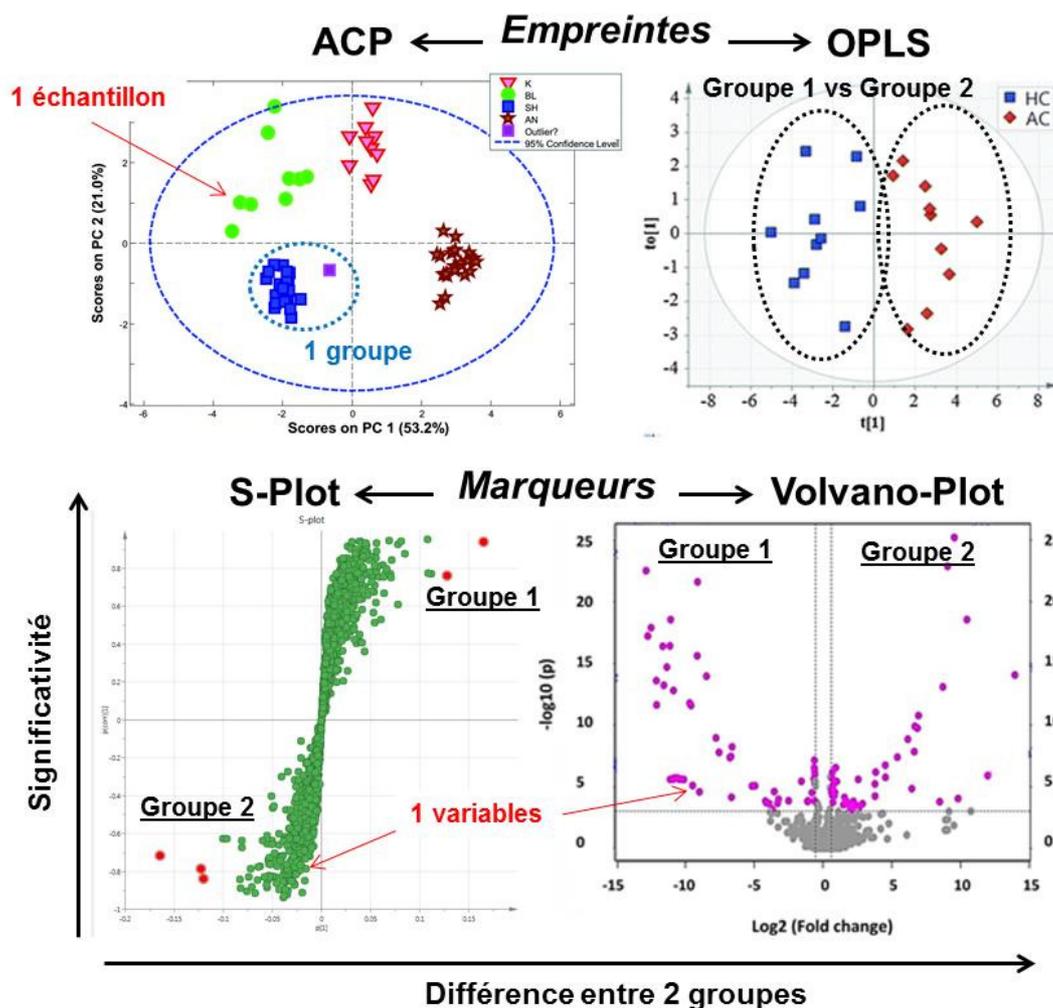
des couplages LC (HPLC, UPLC) ou SFC/UPC<sup>2</sup> et spectrométrie de masse existent et permettent la caractérisation, la détection et la quantification des différentes espèces moléculaires de la plupart des familles lipidiques (stérols esters, prénoles, acides gras libres, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, eicosanoïdes) (Löfgren *et al.* 2012 ; Zhou *et al.* 2014 ; Wei *et al.* 2015 ; Della Corte *et al.* 2015 ; Han 2016). L'inconvénient majeur réside dans la disponibilité des molécules synthétiques nécessaire à l'élaboration de gammes d'étalonnage et par conséquent à l'analyse quantitative. Dès lors, la mesure d'empreintes lipidiques est plébiscitée.

**Mesure d'empreintes lipidiques** – Les analyses lipidomiques impliquent une extraction universelle des lipides de l'échantillon biologique, suivie d'une élution plus ou moins sélective de ces derniers (par familles en phase normale ; par espèces en phase inverse) et d'une détection globale des espèces (ESI en modes positif et négatif) (**Figure 31**). De par la diversité des espèces détectables (plusieurs milliers), le mode de détection conseillé est la spectrométrie de masse haute résolution en mode full-scan (Orbitrap, Q-TOF). L'ensemble des échantillons d'une même expérience est ainsi défini par un nombre de variables communes (lipides potentiels) caractérisées par un temps de rétention et un rapport  $m/z$  (Sandra *et al.* 2010 ; Han *et al.* 2016).



**Figure 31** : Exemple de chromatogrammes obtenus en lipidomique à partir d'un échantillon de plasma analysé en ESI positif et négatif (mode phase inverse, détection Q-TOF)

L’empreinte individuelle est ensuite établie en fonction de l’intensité de chaque variable par rapport à l’ensemble. Des analyses statistiques multivariées comme l’ACP (analyse en composantes principales) ou l’OPLS (*Orthogonal Partial Least Squares*) permettent l’observation graphique des similitudes et des différences entre les échantillons (**Figure 32**). L’ACP permet de visualiser la manière dont se regroupent ou se différencient les échantillons en fonction des caractéristiques de leurs variables (intensité) alors que l’OPLS recherche une séparation entre des groupes prédéfinis au lieu de prendre en compte uniquement la variance. Les diagrammes de scores (S-Plot, Volcano-Plot) sont également utilisés et permettent de mettre en évidence les marqueurs de différences sur une même figure (**Figure 32**). Les axes en X et Y représentent respectivement l’impact de la variable et sa fiabilité statistique, les meilleurs marqueurs étant les points ayant un impact important et une significativité statistique élevée (Gallart-Ayala *et al.* 2013).



**Figure 32** : Exemples de représentations graphiques statistiques multivariées utilisées en lipidomique

Les marqueurs les plus discriminants, mis en évidence par les représentations S-Plot ou Volcano-Plot, sont ensuite caractérisés en fonction de l'exactitude de leur rapport  $m/z$  (haute résolution), la cohérence de leur temps de rétention et leur schéma de fragmentation obtenu en modes positif et/ou négatif. Le rapport  $m/z$  permet d'évaluer la composition élémentaire du composé qu'il est possible de comparer avec des bases de données en ligne ou élaborées au sein du laboratoire (Gallart-Ayala *et al.* 2013). La correspondance est jugée comme fortement probable pour une erreur à  $\pm 5$  ppm (haute résolution). Cette méthode de comparaison nécessite une bonne connaissance des adduits possiblement formés lors de l'ionisation pour telle ou telle espèce (Tableau 7). Les schémas de fragmentation sont ensuite obtenus en modes MS/MS (réinjection de l'échantillon) ou MS<sup>E</sup> (en simultané). Les *zwitterions* (modes positif/négatif) auront des schémas de fragmentation différents suivant la polarité, apportant de nombreux indices quant à leur structure (Figure 14). Certaines espèces lipidiques présenteront également des fragments très caractéristiques facilitant leur identification (Tableau 7) (Bird *et al.* 2013 ; Pati *et al.* 2016).

**Tableau 7 :** Exemple d'adduits majoritairement observés lors de l'ionisation des lipides en ESI et fragments caractéristiques en mode MS/MS ou MS<sup>E</sup>

Familles	Espèces	Adduits majoritaires ESI + <i>Fragments spécifiques</i>	Adduits majoritaires ESI - <i>Fragments spécifiques</i>
Acyles gras	AG	---	[M-H] <sup>-</sup>
Stérols	Stérols esters	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> / [M+Na] <sup>+</sup> <i>Ion m/z 369</i>	---
Glycérolipides	DG, TG	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> / [M+Na] <sup>+</sup> <i>Pertes neutres de NH<sub>3</sub> et d'un acide gras</i>	---
Sphingolipides	SM	[M+H] <sup>+</sup> <i>Ion m/z 184</i>	[M+HCOO] <sup>-</sup>
	Cer	[M+H] <sup>+</sup> / [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> <i>Ion m/z 264</i>	[M+HCOO] <sup>-</sup>
	Sphingoïdes	[M+H] <sup>+</sup> <i>Ion m/z 264</i>	[M-H] <sup>-</sup>

Familles	Espèces	Adduits majoritaires ESI + <i>Fragments spécifiques</i>	Adduits majoritaires ESI - <i>Fragments spécifiques</i>
Glycérophospho- lipides	PC, LPC	$[M+H]^+$ , <i>Ion m/z 184</i>	$[M+HCOO]^-$ <i>Acides gras libres en <math>[M-H]^-</math></i>
	PE, LPE	$[M+H]^+$ <i>Ion m/z 141</i>	$[M-H]^-$ <i>Acides gras libres en <math>[M-H]^-</math></i>
	PS	---	$[M-H]^-$ <i>Acides gras libres en <math>[M-H]^-</math></i>
	PI	$[M+NH_4]^+$ <i>Ion m/z 87</i>	---
	PG	$[M+NH_4]^+$	$[M-H]^-$ <i>Acides gras libres en <math>[M-H]^-</math></i>
	PA	---	$[M-H]^-$ <i>Acides gras libres en <math>[M-H]^-</math></i>

AG, acides gras. TG, triglycérides. DG, diglycérides. PE, phosphatidyléthanolamine. LPE, lysophosphatidyléthanolamine. PC, phosphatidylcholine. LPC, lysophosphatidylcholine. PS, phosphatidylsérine. PG, phosphatidylglycérol. PA, acide phosphatidique PI, phosphatidylinositol. SM, sphingomyélines. Cer, céramides.

**Mesure des enrichissements** – Pour les lipides, la mesure des enrichissements peut se faire selon les méthodes développées pour leur quantification (GC-MS, LC-MS/MS...). Néanmoins, si le niveau de marquage est du type « atomique », il est nécessaire de bien caractériser les espèces en présence d'un point de vue isotopologique et isotopomérique (Castro-Perez *et al.* 2011 ; Conway *et al.* 2012 ; McLaren *et al.* 2013b). En effet, de nombreux états d'enrichissements peuvent être observés pour les lipides si le traceur utilisé est très précoce dans leur biosynthèse ( $^{13}C$ -actétate,  $^2H_2O$ ...). Il est donc nécessaire de bien définir le pool précurseur qui devra être analysé dans les mêmes conditions (suivi du même isotopologue). Pour les mesures cinétiques de lipides à taux de renouvellement lent et donc à faible niveau d'enrichissement, les couplages GC-C-IRMS sont ainsi considérés comme plus fiables (Schierbeek *et al.* 2012 ; Stellaard & Lütjohann 2015). Avec ces systèmes, toute notion d'isotopologues et d'isotopomères n'a plus lieu d'être. Le signal relatif à l'état d'enrichissement n'est donc plus dilué (Brunengraber *et al.* 1997).

**OBJECTIFS**

**DE LA THESE**



**Etat des lieux** – Les altérations du métabolisme lipidique exposent à un fort risque d'incidents cardiovasculaires et l'étude du lipidome est essentielle à la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents. L'analyse des flux métaboliques des différents composants des lipoprotéines plasmatiques constitue une voie de recherche puissante pour l'obtention d'informations relatives à ces dérèglements. Ces analyses sont aujourd'hui essentiellement réalisées *via* l'utilisation de traceurs enrichis en isotopes stables. Les cinétiques d'incorporation de ces précurseurs de synthèse au sein des entités moléculaires permettent d'évaluer leurs vitesses de production et de dégradation. Dès lors, il est possible de mettre en évidence les dérèglements engendrés par une pathologie ainsi que l'efficacité d'une intervention thérapeutique.

**Premier objectif** – L'analyse cinétique des composantes protéiques des lipoprotéines est complexe et nécessite le recours à plusieurs techniques d'analyses distinctes, parfois complexes et donc souvent limitées à certaines apolipoprotéines. Le développement de méthodes analytiques de pointe, combinant la protéolyse enzymatique et l'analyse ciblée de peptides signatures par LC-MS/MS, révolutionne depuis peu ces thématiques de recherche. Elles permettent en effet l'accès simultané à de nombreuses informations comme la concentration, les modifications polymorphiques et/ou post-traductionnelles et les niveaux d'incorporation des traceurs au cours du temps. En outre, la méthodologie LC-MS/MS a le mérite d'être bien plus rapide et beaucoup plus économique (temps, consommable, prise d'essai). Notre premier objectif a donc été de mettre en place ces méthodologies au sein du laboratoire. Le développement expérimental a été initié sur l'apo(a), du fait de sa grande complexité, puis étendu à de nombreuses autres apolipoprotéines jusqu'à atteindre les limites techniques de la méthode.

**Second objectif** – Le traceur utilisé pour les cinétiques protéiques ( $^2\text{H}_3$ -leucine) permet un marquage à l'échelle moléculaire. Après protéolyse enzymatique et réduction des protéines en peptides, le nombre résiduel de leucine est souvent très limité. Les notions d'isotopologie et d'isotopométrie sont donc rarement handicapantes. Dans le cas des lipides, le traceur que nous utilisons ( $^{13}\text{C}_2$ -acétate) permet un marquage à l'échelle atomique ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ). Un grand nombre d'isotopologues sont alors potentiellement formés, chacun associé à un grand nombre d'isotopomères. Ce nombre d'entités isotopiques est probablement dépendant du temps d'exposition du composé au traceur durant sa synthèse et, par conséquent, en lien avec son métabolisme. Dès lors, notre second objectif a été le développement de méthodes analytiques ciblées (quantitatives) et non-ciblées (empreintes lipidiques) dans le but d'analyser de façon

statique et dynamique un large spectre de lipides. Nos premiers résultats cinétiques, bien que prometteurs, n'ont pas fait l'objet d'investigations supplémentaires pour ces travaux de thèse. En effet, la complexité des données générées et le grand nombre de questions qui y sont associées pourront faire l'objet d'un nouveau projet.

**Troisième objectif** – Nos deux premiers objectifs nous ont amenés à développer différentes méthodes originales utilisant la spectrométrie de masse, chacune étant en perpétuelle évolution. Ces méthodes nous ont permis d'acquérir rapidement un nombre important de données, tant statiques que dynamiques, en relation avec le métabolisme des lipoprotéines. Dès lors, nous avons appliqué ces méthodes à différents cas concrets afin d'apporter de nouveaux éléments de compréhension sur l'efficacité de traitements hypolipémiant au niveau d'entités moléculaires spécifiques ou, de façon plus fondamentale, sur les aspects physiologiques de composés jusqu'alors peu décrits dans la littérature ou sujets à controverses.

**TRAVAUX**  
**PERSONNELS**



## Article 1

### **Effects of extended-release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients**

Croyal M, Ouguerram K, Passard M, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Billon-Crossouard S, de Gouville AC, Lambert G, Krempf M, Nobécourt E

*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2015**, 35: 2042-2047

L'apo(a) est une glycoprotéine sécrétée par le foie qui se lie de façon covalente à l'apoB100 des LDL pour former la Lp(a). L'apo(a) reste très difficile à analyser par les techniques conventionnelles car, outre sa grande hétérogénéité de concentrations plasmatiques entre individus, elle est sujette à un fort polymorphisme de taille. Seuls quelques traitements, dont l'acide nicotinique, permettent d'abaisser les taux de Lp(a), mais les mécanismes sous-jacents restent peu connus. Nous avons donc développé une méthode LC-MS/MS afin de mieux caractériser cette protéine athérogène. Notre méthode d'analyse a ensuite été utilisée pour l'étude cinétique de l'apo(a) chez 8 patients hypertriglycéridémiques traités à l'acide nicotinique durant 8 semaines. Notre démarche analytique nous a permis de simultanément quantifier la protéine (méthode conventionnelle : ELISA), d'évaluer son polymorphisme de taille (méthode conventionnelle : PCR ou ELISA) et de mesurer les niveaux d'incorporation en  $^2\text{H}_3$ -Leucine au cours du temps (méthode conventionnelle : électrophorèse et GC-MS).

Après modélisation des courbes d'enrichissements isotopiques, l'acide nicotinique a montré un fort effet sur la production de l'apo(a) (-50%) partiellement compensée par une diminution de son catabolisme (-37%). Les concentrations plasmatiques en apo(a) ont ainsi été diminuées de 20%.



## Clinical and Population Studies

### Effects of Extended-Release Nicotinic Acid on Apolipoprotein (a) Kinetics in Hypertriglyceridemic Patients

Mikaël Croyal, Khadija Ouguerram, Maxime Passard,\* Véronique Ferchaud-Roucher,\* Maud Chétiveaux, Stéphanie Billon-Crossouard, Anne-Charlotte de Gouville, Gilles Lambert, Michel Krempf,\* Estelle Nobécourt\*

**Objective**—To determine the mechanisms by which extended-release nicotinic acid reduces circulating lipoprotein (a) concentrations in hypertriglyceridemic patients.

**Approach and Results**—Eight nondiabetic, obese male subjects (aged 48±12 years; body mass index, 31.2±1.8 kg/m<sup>2</sup>) with hypertriglyceridemia (triglycerides, 226±78 mg/dL) were enrolled in an 8 week, double blind, placebo-controlled cross-over study. At the end of each treatment phase, fasted subjects received a 10 μmol/L per kg bolus injection of [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-leucine immediately followed by constant infusion of [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-leucine (10 μmol L<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) for 14 hours, and blood samples were collected. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method was used to study apolipoprotein (a) (Apo(a)) kinetics. The fractional catabolic rate of Apo(a) was calculated with a single compartmental model using the apolipoprotein B100 (ApoB100) containing very low density lipoprotein tracer enrichment as a precursor pool. Extended-release nicotinic acid decreased plasma triglycerides (–46%; *P*=0.023), raised high-density lipoprotein cholesterol (+20%; *P*=0.008), and decreased Apo(a) plasma concentrations (–20%; *P*=0.008). Extended-release nicotinic acid also decreased ApoB100 (22%; *P*=0.008) and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9, –29%; *P*=0.008) plasma concentrations. Apo(a) fractional catabolic rate and production rates were decreased by 37% (0.58±0.28 versus 0.36±0.19 pool/d; *P*=0.008) and 50% (1.4±0.8 versus 0.7±0.4 nmol/kg per day; *P*=0.008), respectively.

**Conclusions**—Extended-release nicotinic acid treatment decreased Apo(a) plasma concentrations by 20%, production rates by 50%, and catabolism by 37%. ApoB100 and PCSK9 concentrations were also decreased by treatment, but no correlation was found with Apo(a) kinetic parameters. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:2042-2047. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.305835.)

**Key Words:** apolipoprotein (a) ■ hypertriglyceridemia ■ kinetics ■ lipoprotein (a) ■ niacin

Lipoprotein (a) [Lp(a)] is a proatherogenic lipoprotein composed of a low-density lipoprotein (LDL) and apolipoprotein (a) [Apo(a)], a glycoprotein synthesized by the liver and covalently bound to the apolipoprotein B100 (ApoB100).<sup>1,2</sup> Apo(a) is composed of a protease domain (peptidase S1) and kringle IV and kringle V domains. Kringle V, the peptidase S1 domain, and the Kringle IV (KIV) domains (KIV<sub>1</sub> to KIV<sub>10</sub>) are expressed once, except KIV<sub>2</sub>, which is repeated 3× to 40×. Apo(a) size is genetically determined and is highly heterogeneous among and within patients, as most individuals have 2 circulating isoforms encoded by 2 different alleles. A low copy number of KIV<sub>2</sub> has been associated with higher plasma Lp(a) concentration, possibly because of differences in Apo(a) production rates.<sup>1,3</sup>

Lp(a) is associated with increased cardiovascular disease.<sup>1,4</sup> Robust epidemiological and Mendelian randomization

studies support the hypothesis that increased Lp(a) plasma concentrations are related to an increased risk of coronary heart disease,<sup>5,6</sup> even in cases of high LDL cholesterol (LDL-C).<sup>7</sup> The European Atherosclerosis Society has proposed that the optimal Lp(a) level should be <50 mg/dL.<sup>4</sup> Currently, there are few available options for lowering Lp(a).<sup>7-11</sup> Lipoprotein apheresis was approved in Germany for patients with progressive cardiovascular diseases to control LDL-C levels and Lp(a). Recently, developed lipid-lowering treatments, include targeting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and inhibiting cholesteryl ester transfer protein, have shown significant lowering of Lp(a).<sup>1</sup>

Extended-release nicotinic acid (ERN) is the only available oral treatment that is able to lower Lp(a) by 25% to 30%.<sup>12</sup> In vitro studies have shown that nicotinic acid could increase retention of Apo(a) at the hepatocyte surface, and it may also

Received on: April 30, 2015; final version accepted on: June 24, 2015.

From the CRNH, West Human Nutrition Research Center, Nantes, France (M.C., K.O., M.P., V.F.-R., S.B.-C., G.L., M.K., E.N.); UMR 1280 PhAN Laboratory, National Institute of Agronomic Research, INRA, CHU Hôtel Dieu, HNB1, Nantes, France (M.C., K.O., M.P., V.F.-R., S.B.-C., G.L., M.K.); University of Nantes and Medical School, Nantes, France (M.C., K.O., M.P., M.C., S.B.-C., G.L., M.K., E.N.); GlaxoSmithKline, Les Ulis, France (A.-C.d.G.); and Endocrinology and Nutrition Department, G and R Laennec Hospital, Bd Jacques Monod, Nantes, France (M.K., E.N.).

\*These authors contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.115.305835/-DC1>.

Correspondence to Michel Krempf, MD, PhD, University of Nantes, 8 quai Moncoussu, 44000 Nantes, France. E-mail [michel.krempf@univ-nantes.fr](mailto:michel.krempf@univ-nantes.fr)

© 2015 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.305835

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
<b>Apo(a)</b>	apolipoprotein (a)
<b>ERN</b>	extended-release nicotinic acid
<b>FCR</b>	fractional catabolic rate
<b>KIV</b>	kringle type IV domain

inhibit Apo(a) gene transcription.<sup>1,13</sup> Few human studies have looked at Lp(a) metabolism in untreated healthy volunteers,<sup>14</sup> but, to date, there have been no human studies characterizing the effects of ERN on Lp(a) metabolism. New analytical methods based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry and enzymatic proteolysis have simplified the study of apolipoprotein kinetics in humans.<sup>15–17</sup> In this study, we applied these approaches to analyze the effects of ERN on Apo(a) metabolism in 8 hypertriglyceridemic patients.

## Materials and Methods

Eight nondiabetic, overweight male subjects (aged 48±12 years; body mass index, 31.2±1.8 kg/m<sup>2</sup>; waist circumference, 106±4.9 cm) with hypertriglyceridemia (triglycerides, 226±78 mg/dL) were enrolled in a randomized crossover controlled study (8 weeks/phase and a 4-week washout interval) comparing 2 g/day ERN (gradually increased from 0.5 to 2.0 g/day in the first 4 weeks to avoid flushing effects and associated in both arms with 300 mg/day of lysine acetylsalicylate) with placebo. Plasma lipids and lipoproteins, as well as lipoprotein kinetics, were assessed as described in detail in the supplemental Materials and Methods section available in the online-only Data Supplement.

## Results

Overall, ERN treatment was well tolerated and no dropout or major flushes were observed. A small and nonsignificant increase of fasting blood glucose and insulin concentrations were observed with ERN (not shown) as well as HOMA-IR index (3.8±3.7 versus 5.6±2.7, NS) Compared with placebo,

**Table. Results of Major Biochemical Measurements**

Patients	TG	TC	LDL-C	HDL-C	PCSK9	ApoA-I	Plasma ApoB100	VLDL-ApoB100	LDL-ApoB100	Plasma Apo(a)	KIV Repeats
Placebo											
No. 1	174	152	83	34	360	110	60	6	37	55	13
No.2	217	276	179	51	374	150	140	10	79	46	13
No.3	192	265	185	41	196	130	130	17	84	66	20
No.4	202	253	147	66	272	180	120	6	73	45	12
No.5	340	158	63	27	206	120	70	9	38	43	13
No.6	129	231	150	46	237	130	100	7	61	52	12
No.7	293	209	120	29	203	110	118	12	44	85	16
No.8	224	177	97	35	234	120	90	11	43	41	13
Mean	221	215	128	41	260	131	104	10	58	54	14
SD	67	49	45	13	70	24	29	4	19	15	3
ERN											
No. 1	62	128	66	49	179	120	50	3	16	45	13
No. 2	111	241	136	57	188	140	100	6	65	29	13
No. 3	89	184	118	49	80	130	90	13	66	48	18
No. 4	79	195	112	67	149	170	80	6	75	44	12
No. 5	96	132	74	38	154	130	60	10	36	32	12
No. 6	117	200	115	48	158	130	80	7	43	42	12
No. 7	125	199	131	43	133	136	117	13	48	75	17
No. 8	262	160	68	39	197	130	70	7	52	34	13
Mean	118	180	103	49	155	136	81	8	50	44	14
SD	62	38	29	10	37	15	22	3	19	14	3
P value*	0.023	0.008	0.039	0.008	0.008	0.531	0.008	0.156	0.211	0.008	0.750

PCSK9, ApoA-I, ApoB100, and Apo(a) plasma concentrations expressed in ng/mL, mg/dL, mg/dL, and nM, respectively. KIV repeats were assessed by the targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MS)/MS analysis of a specific peptide of the repeated domain as described in the supplemental file. ApoA indicates apolipoprotein A; ERN, extended-release nicotinic acid; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol (mg/dL); KIV, Kringle IV; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol (mg/dL); N/C, not calculated; TC, total cholesterol (mg/dL); TG: plasma triglycerides (mg/dL); and VLDL, very low-density lipoprotein.

\*Nonparametric Wilcoxon-matched pairs signed rank test.

2044 Arterioscler Thromb Vasc Biol September 2015

ERN decreased plasma triglycerides by 46% ( $118 \pm 62$  versus  $221 \pm 67$  mg/dL;  $P=0.023$ ), total cholesterol by 16% ( $180 \pm 38$  versus  $215 \pm 49$  mg/dL;  $P=0.008$ ), LDL-C by 20% ( $103 \pm 29$  versus  $128 \pm 45$  mg/dL;  $P=0.039$ ), ApoB100 by 22% ( $81 \pm 22$  versus  $104 \pm 29$  mg/dL;  $P=0.008$ ), and Apo(a) by 20% ( $44 \pm 14$  versus  $54 \pm 15$  nmol/L;  $P=0.008$ ; Table). In contrast, ERN raised high-density lipoprotein cholesterol by 20% ( $49 \pm 10$  versus  $41 \pm 13$  mg/dL;  $P=0.008$ ) but did not increase apolipoprotein A-I concentrations ( $136 \pm 15$  versus  $131 \pm 24$  mg/dL;  $P=0.531$ ; Table). The dominant isoform size of Apo(a) ranged from 12 to 18 KIV repeats (Table). The average size of Apo(a) was slightly modified in 3 subjects (6%–10%). Plasma PCSK9 concentrations were decreased by 29% with ERN ( $180 \pm 53$  versus  $260 \pm 70$  ng/mL;  $P=0.008$ ; Table).

ERN affected the mean  $^2\text{H}_3$ -Leucine incorporation during the course of the tracer infusion for Apo(a) ( $P<0.05$ ; Figure 1). Compared with placebo, ERN decreased the fractional catabolic rate (FCR) of Apo(a) by 37% ( $0.36 \pm 0.19$  versus  $0.58 \pm 0.28$  pool/d;  $P=0.008$ ), whereas no significant change was observed in ApoB100-VLDL (Figure 2), and a slight increase of ApoB100-LDL FCR was shown (+12%;  $P=0.031$ ; 1-tailed). ERN treatment also reduced the Apo(a) production rate by 50% compared with placebo ( $0.7 \pm 0.4$  versus  $1.4 \pm 0.8$  nmol/kg per day;  $P=0.008$ ) but had no significant effects on ApoB100-VLDL or ApoB100-LDL production rates (Figure 2). Apo(a) FCRs and production rates

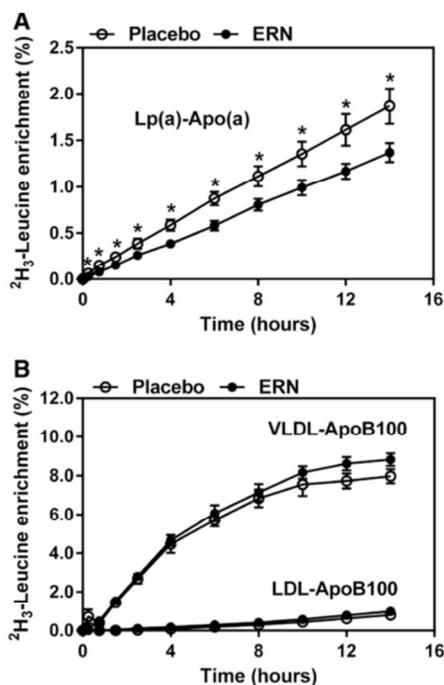
were significantly correlated ( $P<0.0001$ ;  $r=0.8223$ ) suggesting that these 2 processes are under control of similar pathways. No significant correlations were observed between ApoB100 plasma concentrations and Apo(a) kinetic data. Similarly, no significant correlation was observed between HOMA-IR index or changes in PCSK9 plasma concentrations and Apo(a) catabolic rates.

## Discussion

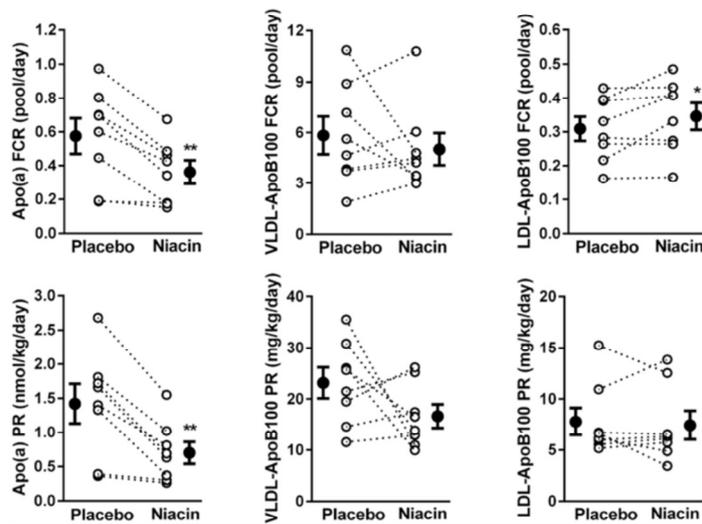
The new liquid chromatography–tandem mass spectrometry method used in this study enabled analysis of in vivo effects of ERN on Apo(a) metabolism in hypertriglyceridemic subjects. As expected, ERN significantly decreased triglycerides and Apo(a) and ApoB100 plasma concentrations and raised high-density lipoprotein cholesterol. Apo(a) production and catabolic rates were significantly reduced, while no significant changes were observed in ApoB100-VLDL kinetics. An increase in ApoB100-LDL catabolism was shown, which may be related to the significant decrease of PCSK9 plasma concentrations.

Because of high discrepancies in plasma concentrations and complexity of size determination, conventional analytical methods<sup>18,19</sup> are not relevant for Apo(a) measurements.<sup>11,16,17</sup> This study confirmed that enzymatic proteolysis and subsequent liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of specific peptides overcome these difficulties (Materials and Methods section in the online-only Data Supplement).<sup>15–17</sup> Our results are in agreement with a study using similar methods and a single compartment model to analyze Apo(a) metabolism in 3 healthy subjects<sup>16</sup> and to other data reported in a using gas chromatography–mass spectrometry study and a multicompartiment modeling.<sup>20</sup> Together, these comparisons validated our analytic method and the mono compartmental model we have used. Compared with studies in healthy subjects without dyslipidemias, this study showed that hypertriglyceridemia does not have a strong effect on Apo(a) kinetics, although data are in near the upper limits of the reported normal range.<sup>20</sup> We were also amazed to observe a slight decrease of size of Apo(a) in few subjects with ERN treatment. This was probably because of a slight change in the proportion of the 2 isoforms related to unknown effects of ERN or more likely to the tolerated precision of the liquid chromatography–tandem mass spectrometry method ( $\pm 15\%$ ) and the small number of patients.

This study showed that ERN was able to significantly decrease Apo(a) production rates by 50%, consistent with in vitro studies revealing the impacts of ERN on Apo(a) hepatic production and on ApoB100 availability for Lp(a) synthesis.<sup>21</sup> Nicotinic acid is already known to inhibit hepatocyte diacylglycerol acyltransferase-2, a key enzyme for triglyceride synthesis, accelerating intracellular hepatic ApoB100 degradation and decreasing hepatic ApoB100-VLDL and ApoB100-LDL secretion rates.<sup>21</sup> Other studies have shown that nicotinic acid increased retention of Apo(a) at the hepatocyte surface and also directly inhibited transcription of the Apo(a) gene.<sup>1,13</sup> This study did not show any association between ApoB100-LDL or



**Figure 1.** Mean change in  $^2\text{H}_3$ -Leucine incorporation during the course of the tracer infusion in 8 patients treated with placebo or extended-release nicotinic acid (ERN). **A**, Results obtained for Apo(a) in the Lipoprotein (a) [Lp(a)] fraction and **B** results obtained for ApoB100 in both very low density lipoprotein (VLDL) and LDL fractions. Values are mean  $\pm$  SEM ( $n=8$ ).  $^*P<0.05$  (nonparametric Wilcoxon-matched pairs signed rank test). M3:  $[5,5,5\text{-}^2\text{H}_3]$ -Leucine labeled peptide, M0 indicates unlabeled peptide.



**Figure 2.** Individual and mean  $\pm$  SEM changes in kinetic parameters of Apo(a) and ApoB100. FCR indicates fractional catabolic rate; and PR, production rate. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (nonparametric Wilcoxon-signed rank test).

ApoB100-VLDL and Apo(a) production rate, in agreement with a previous kinetic study of untreated healthy controls having showed that the kinetics of Apo(a)-Lp(a) were similar to ApoB100-Lp(a) but not to ApoB100-VLDL or ApoB100-LDL.<sup>20</sup> The modification of Apo(a) production rate by ERN could thus be a consequence of an inhibition of Apo(a) transcription or a decrease of protein release as discussed above. In addition, ERN did not show significant changes on ApoB100 kinetic parameters in VLDL as previously reported by Lamou-Fava et al.<sup>22</sup> Conversely, Fabbrini et al.<sup>23</sup> have found a significant effect of ERN to reduce VLDL-ApoB100 production rates but the different metabolic states of patients (hepatic steatosis) and the longer duration of treatment (16 weeks) could explain these differences.

Results also showed that ERN was able to significantly decrease the rate of Apo(a) catabolism by 37%, which partially compensated for the change in production rates in the liver. Although catabolic mechanisms of Lp(a) are poorly understood, kidneys seem to play central roles involving binding with megalin/glycoprotein 330.<sup>24</sup> In patients with advanced chronic kidney diseases, elevated plasma Lp(a) concentrations were observed,<sup>25</sup> which were related to decreases in Apo(a) and ApoB100 Lp(a) catabolic rates.<sup>26</sup> It has also been shown that, in patients with chronic kidney diseases, ENR has reduced efficacy.<sup>27</sup>

In addition to the kidney, other mechanisms are likely to occur in the liver. Indeed, Lp(a) metabolism has been linked to the scavenger receptor class B type I,<sup>28</sup> the low-density lipoprotein receptor-related protein 1, the very low-density lipoprotein receptor, plasminogen receptors, and megalin/glycoprotein 330.<sup>24</sup> The role of the LDL receptor on Lp(a) catabolism is controversial. A recent study in HepG2 cells provided evidence that the LDL receptor is implicated in Lp(a) catabolism modulated by PCSK9.<sup>29</sup> Our data do not support this finding as we showed a significant decrease in ApoB100 plasma concentrations (-22%) probably related

to the increase of ApoB100-LDL catabolism (+12%) possibly as a consequence of the decrease in PCSK9 plasma concentrations known to occur with ERN.<sup>30,31</sup> The increase of ApoB100-LDL FCR suggested an enhanced the LDL receptor activity and an increase of Apo(a) catabolism was expected from the HepG2 cell experiment.<sup>29</sup> We have observed just the opposite but it is possible that the role of the LDL receptor in Lp(a) catabolism could have been overshadowed by changes in other Lp(a) catabolic pathways related to ERN as we measured the total in vivo disappearance. In addition, no significant relationship was observed between changes of Apo(a) FCR and PCSK9 plasma concentrations ( $P = 0.2436$ ;  $r = 0.4668$ ), which do not support a central role of PCSK9 in Apo(a) catabolism.

This study has some limitations. To follow the guidelines of ERN prescription, only patients with hypertriglyceridemia were selected. Although unlikely, it is not possible to rule out that different results could have been observed in lean normolipidemic subjects. It is also difficult to anticipate the mechanisms involved in patients with elevated baseline Lp(a) and the effect of ERN in these individual. We were not able to get a good recovery of Lp(a) in the ApoB100 containing particles. Then, we only present Apo(a) kinetics as a whole and not the fine tuning and exchanges of Lp(a) related to measured activities of lipases or transfer proteins. However, this simple approach allows to get new information on the mechanisms involved in the decrease of plasma Lp(a) related to ERN treatment and could initiated new researches. Finally, this study was performed in men with no statin treatment and it is not known if the sex or an added treatment could have changed the results.

In conclusion, decreased plasma Lp(a) in ERN-treated patients was related to a decrease of Apo(a) production rate, which was partially compensated by decreased catabolism. The regulatory mechanisms involved in changes of both production and catabolism of Apo(a) by ERN seem to be connected. No cardiovascular benefits of ERN were reported in

2046 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* September 2015

recent cardiovascular outcome trials but with a decrease of plasma Lp(a) of only 20%.<sup>32-35</sup> A better understanding of the mechanisms responsible for decreased Lp(a) catabolism associated with ERN treatment could help the development of new derived niacin treatments targeting only the production rate leading to a more effective therapy for lowering Lp(a) plasma concentrations.

### Acknowledgments

We thank the staff of the Clinical Investigation Center of the University Hospital in Nantes, especially Dr Yassine Zair and Eliane Hiverneau for their invaluable help with patients and blood collection. We also thank Clémence Guéhéneux for technical help developing this method.

### Sources of Funding

This work was partly funded by GlaxoSmithKline and the Biogenouest CORSAIRE core facility.

### Disclosures

None.

### References

- Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med*. 2013;273:6–30. doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.02592.x.
- Utermann G, Weber W. Protein composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *FEBS Lett*. 1983;154:357–361.
- Rader DJ, Cain W, Ikewaki K, Talley G, Zech LA, Usher D, Brewer HB Jr. The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J Clin Invest*. 1994;93:2758–2763. doi: 10.1172/JCI117292.
- Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, et al; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*. 2010;31:2844–2853. doi: 10.1093/eurheartj/ehq386.
- Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, et al; PROCARDIS Consortium. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N Engl J Med*. 2009;361:2518–2528. doi: 10.1056/NEJMoa0902604.
- Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2009;301:2331–2339. doi: 10.1001/jama.2009.801.
- NACB LMPG Committee Members, Myers GL, Christenson RH, Cushman M, Ballantyne CM, Cooper GR, Pfeiffer CM, Grundy SM, Labarthe DR, Levy D, Rifai N, Wilson PW. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines: emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease. *Clin Chem*. 2009;55:378–384.
- Cannon CP, Shah S, Dansky HM, Davidson M, Brinton EA, Gotto AM, Stepanavage M, Liu SX, Gibbons P, Ashraf TB, Zafarino J, Mitchell Y, Barter P; Determining the Efficacy and Tolerability Investigators. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2010;363:2406–2415. doi: 10.1056/NEJMoa1009744.
- Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charnig MJ, Cromwell WC, Lachmann RH, Gaudet D, Tan JL, Chasan-Taber S, Tribble DL, Flaim JD, Crooke ST, Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010;375:998–1006. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60284-X.
- Sahebkar A, Watts GF. New therapies targeting apoB metabolism for high-risk patients with inherited dyslipidaemias: what can the clinician expect? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013;27:559–567. doi: 10.1007/s10557-013-6479-4.
- McConnell JP, Guadagno PA, Dayspring TD, Hoefner DM, Thiselton DL, Warnick GR, Harris WS. Lipoprotein(a) mass: a massively misunderstood metric. *J Clin Lipidol*. 2014;8:550–553. doi: 10.1016/j.jacl.2014.08.003.
- Carlson LA. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50<sup>th</sup> anniversary review. *J Intern Med*. 2005;258:94–114. doi: 10.1111/j.1365-2796.2005.01528.x.
- Chennamsetty I, Kostner KM, Claudel T, Vinod M, Frank S, Weiss TS, Trauner M, Kostner GM. Nicotinic acid inhibits hepatic APOA gene expression: studies in humans and in transgenic mice. *J Lipid Res*. 2012;53:2405–2412. doi: 10.1194/jlr.M029769.
- Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Marcovina SM. Lipoprotein(a) metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25:189–193. doi: 10.1097/MOL.0000000000000070.
- Pan Y, Zhou H, Mahsut A, et al. Static and turnover kinetic measurement of protein biomarkers involved in triglyceride metabolism including apoB48 and apoA5 by LC/MS/MS. *J Lipid Res*. 2014;55:1179–1187. doi: 10.1194/jlr.D047829.
- Zhou H, Castro-Perez J, Lassman ME, et al. Measurement of apo(a) kinetics in human subjects using a microfluidic device with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2013;27:1294–1302. doi: 10.1002/rcm.6572.
- Lassman ME, McLaughlin TM, Zhou H, Pan Y, Marcovina SM, Laterza O, Roddy TP. Simultaneous quantitation and size characterization of apolipoprotein(a) by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2014;28:1101–1106. doi: 10.1002/rcm.6883.
- Ouguerram K, Magot T, Zaïr Y, Marchini JS, Charbonnel B, Laouenan H, Krempf M. Effect of atorvastatin on apolipoprotein B100 containing lipoprotein metabolism in type-2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306:332–337. doi: 10.1124/jpet.103.048991.
- Foster DM, Barrett PH, Toffolo G, Beltz WF, Cobelli C. Estimating the fractional synthetic rate of plasma apolipoproteins and lipids from stable isotope data. *J Lipid Res*. 1993;34:2193–2205.
- Frischmann ME, Ikewaki K, Trenkwalder E, Lamina C, Dieplinger B, Soufi M, Schweer H, Schaefer JR, König P, Kronenberg F, Dieplinger H. *In vivo* stable-isotope kinetic study suggests intracellular assembly of lipoprotein(a). *Atherosclerosis*. 2012;225:322–327. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.031.
- Kamanna VS, Kashyap ML. Mechanism of action of niacin. *Am J Cardiol*. 2008;101(8A):20B–26B. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.02.029.
- Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Barrett PH, Buchsbaum A, Nyaku M, Horvath KV, Asztalos BF, Otokoza S, Ai M, Matthan NR, Lichtenstein AH, Dolnikowski GG, Schaefer EJ. Extended-release niacin alters the metabolism of plasma apolipoprotein (Apo) A-I and ApoB-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1672–1678. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.164541.
- Fabbrini E, Mohammed BS, Korenblat KM, Magkos F, McCrea J, Patterson BW, Klein S. Effect of fenofibrate and niacin on intrahepatic triglyceride content, very low-density lipoprotein kinetics, and insulin action in obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:2727–2735. doi: 10.1210/jc.2009-2622.
- Niemeier A, Willnow T, Dieplinger H, Jacobsen C, Meyer N, Hilpert J, Beisiegel U. Identification of megalin/gp330 as a receptor for lipoprotein(a) *in vitro*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:552–561.
- Kronenberg F, Utermann G, Dieplinger H. Lipoprotein(a) in renal disease. *Am J Kidney Dis*. 1996;27:1–25.
- Frischmann ME, Kronenberg F, Trenkwalder E, Schaefer JR, Schweer H, Dieplinger B, Koenig P, Ikewaki K, Dieplinger H. *In vivo* turnover study demonstrates diminished clearance of lipoprotein(a) in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2007;71:1036–1043. doi: 10.1038/sj.ki.5002131.
- Kalil RS, Wang JH, de Boer IH, Mathew RO, Ix JH, Asif A, Shi X, Boden WE. Effect of extended-release niacin on cardiovascular events and kidney function in chronic kidney disease: a post hoc analysis of the AIM-HIGH trial. *Kidney Int*. 2015;doi: 10.1038/ki.2014.383.
- Yang XP, Amar MJ, Vaisman B, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Freeman LA, Kurlander RJ, Patterson AP, Becker LC, Remaley AT. Scavenger receptor-BI is a receptor for lipoprotein(a). *J Lipid Res*. 2013;54:2450–2457. doi: 10.1194/jlr.M038877.
- Romagnuolo R, Scipione C, Boffa MB, Marcovina SM, Seidah NG, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) catabolism is regulated by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 through the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 2015;290:11649–11662. doi: 10.1074/jbc.M114.611988.
- Khera AV, Qamar A, Reilly MP, Dunbar RL, Rader DJ. Effects of niacin, statin, and fenofibrate on circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 levels in patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol*. 2015;115:178–182. doi: 10.1016/j.amjcard.2014.10.018.

31. Vergès B, Duvillard L, Brindisi MC, Gautier E, Krempf M, Costet P, Cariou B. Lack of association between plasma PCSK9 and LDL-*apoB*100 catabolism in patients with uncontrolled type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2011;219:342–348. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.098.
32. Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, McBride R, Teo K, Weintraub W; AIM-HIGH Investigators. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011;365:2255–2267. doi: 10.1056/NEJMoa1107579.
33. Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, Parish S, Aung T, Tomson J, Wallendszus K, Craig M, Jiang L, Collins R, Armitage J; HPS2-THRIVE Collaborative Group. Effects of extended-release niacin with laropirant in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2014;371:203–212. doi: 10.1056/NEJMoa1300955.
34. HPS2-THRIVE Collaborative Group. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropirant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *Eur Heart J*. 2013;34:1279–1291.
35. Albers JJ, Slee A, O'Brien KD, Robinson JG, Kashyap ML, Kwiterovich PO Jr, Xu P, Marcovina SM. Relationship of apolipoproteins A-I and B, and lipoprotein(a) to cardiovascular outcomes: the AIM-HIGH trial (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglyceride and Impact on Global Health Outcomes). *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:1575–1579. doi: 10.1016/j.jacc.2013.06.051.

### Significance

Apolipoprotein (a) is a major component of lipoprotein (a) and has a genetically controlled, highly polymorphic size strongly associated with risk of coronary heart disease. Although some treatments, such as extended-release nicotinic acid, lower lipoprotein (a) plasma concentrations, the exact mechanisms underlying the reductions remain unclear. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method was recently developed for apolipoprotein (a) measurements. This method was used here to study apolipoprotein (a) kinetics in 8 hypertriglyceridemic patients treated with extended-release nicotinic acid. Treatment decreased apolipoprotein (a) plasma concentrations by 20% and decreased production rates by 50%. These changes were partially compensated by decreased catabolism (–37% compared with placebo). Apolipoprotein B100 and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 plasma concentrations were also decreased by treatment, but no correlation was found with apolipoprotein (a) kinetic parameters. Therefore, extended-release nicotinic acid has impacts on lipoprotein (a) levels and apolipoprotein (a) synthesis and catabolism.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Patients** – Patients that met inclusion criteria (male, age 18 to 65 years, plasma triglyceride concentration 150 to 400 mg/gL, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) below 60 mg/dL, waist circumference > 94 cm and body mass index 27 to 35 kg/m<sup>2</sup>) were included in a double blind, placebo controlled cross-over 8 week study. These criteria were selected according to the European definition of the metabolic syndrome from the International Diabetes Federation (1) and also according to the ERN guidelines for prescription (2). Patients diagnosed with cancer, diabetes mellitus, hepatic, renal, or digestive disorders, and hypertension and those that received chronic medical treatment that interfered with lipid metabolism were excluded from the study. Each subject received extended-release nicotinic acid (ERN, Niaspan<sup>®</sup>, Merck Clevenot, France) and placebo in a random order for eight weeks. A two-week interval was included between the two treatments. To minimize flushing effects, the daily dose of ERN was gradually increased from 0.5 to 2.0 g/day in the first four weeks, then kept constant at 2.0 g/day during the last four weeks and associated in both arms with 300 mg/day of lysine acetylsalicylate). Regular phone calls and intermediate visit (4 weeks) were organized to control for treatment compliance. At the end of each treatment phase, ERN or placebo were given after an overnight fast, and subjects received a 10 µM/kg bolus injection of [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-Leucine immediately followed by constant infusion of [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-Leucine (10 µM/kg/h) for 14 hours. Subjects were only allowed to drink water until the end of the tracer infusion. Blood samples were collected at 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, and 180 minutes then at 4, 6, 8, 10, 12 and 14 hours. The Ethics Committee of Nantes University Hospital approved the clinical protocol, and a written informed consent was obtained from each subject (reference trial number: NCT01216956).

**Sample collection and preparation** – Blood samples were collected in EDTA tubes (Venoject, Paris, France), and plasma was separated by centrifugation at 4 °C for 30 minutes and stored at -80 °C until analysis. Lipoproteins fractions, including very low-density lipoprotein (VLDL, <1.006 g/mL), intermediate density lipoprotein (IDL, 1.006 to 1.019 g/mL), low-density lipoprotein (LDL, 1.019 to 1.063 g/mL) and high-density lipoprotein (HDL, 1.063 to 1.210 g/mL), were separated by density gradient ultracentrifugation as described previously (3, 4) and stored at -80 °C until analysis.

**Chemicals** – UPLC/MS-grade acetonitrile, water, and 99% formic acid were purchased from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Ammonium bicarbonate (AB), dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IA), sodium deoxycholate (SDC), trypsin, ammonium hydroxide (NaOH), and 37% hydrochloric acid (HCl) were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Synthetic peptides LFLEPTQADIALLK, [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-FLEPTQADIALLK, LFLEPTQADIALL-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-K, GTYSTTVTGR, and GTYSTTVTG-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>]-R were purchased from Thermo Scientific Biopolymers (Einsteinstrasse, Germany).

**Measures of plasma concentrations of the lipid and glucose parameters** – Cholesterol and triglyceride concentrations were measured using enzymatic test kits from Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany). ApoA-I concentrations were measured by immunonephelometry (Behring, Rueil Malmaison, France), and ApoB100 concentrations were obtained using selective precipitation and mass spectrometry (5). Plasma PCSK9 concentrations were measured by ELISA (R&D Systems, Lille, France). Fasting blood glucose and insulin concentrations were measured as previously reported as well as the HOMA-IR index calculation (6).

**Measurement of ApoB100 Leucine enrichment** – Isolation and measurement of Leucine enrichment in ApoB100 were described previously (3). Briefly, ApoB100-containing lipoprotein fractions were isolated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and then hydrolyzed with HCl. Amino acids were purified by cation exchange chromatography, derivatized (N-Propanol-acetylchlorid and heptafluorobutyric acid), and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry to determine [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-Leucine enrichment.

**Selection of proteotypic Apo(a) peptides** – Apo(a) sequences were Blast searched using the UNIPROT tool ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), and theoretical proteotypic peptides were searched using the free software peptide mass calculator ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass](http://web.expasy.org/peptide_mass)). Peptide candidates were selected to maximize sensitivity, specificity, and stability. Peptides containing methionine and cysteine were not considered due to potential oxidation. As described by Lassman et al. (7) and Zhou et al. (8), LFLEPTQADIALLK was selected for Apo(a) quantification and kinetic measurements, and GTYSTTVTGR was selected for Apo(a) size characterization. The LFLEPTQADIALLK and GTYSTTVTGR peptides are located in the Peptidase S1 and kringle IV<sub>2</sub> domains, respectively.

**Sample preparation for Apo(a) quantitation and size characterization in plasma** – LFLEPTQADIALLK, LFLEPTQADIALL-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>]K, GTYSTTVTGR, and GTYSTTVTG-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>]R synthetic peptides were dissolved in a water/acetonitrile mixture (50/50, v/v) containing 0.1% formic acid at a concentration of 100 μM and were stored at -20°C in aliquots of 20 μL. Stock solutions of LFLEPTQADIALLK and GTYSTTVTGR were then mixed and diluted in 0.5% SDC to produce seven 10X standard solutions ranging from 5.0 to 0.05 μM and 20.0 to 0.2 μM for LFLEPTQADIALLK and GTYSTTVTGR, respectively. Plasma samples (10 μL) were mixed and diluted with 15 μL of 0.5% SDC. LFLEPTQADIALL-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>]K and GTYSTTVTG-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>]R were used as internal standards (ISs). Ten microliters (10 μL) of each IS stock solution were extemporaneously added to 9,980 μL of a reduction buffer (pH 8) containing 55 mM AB, 0.5% SDC, and 5.5 mM DTT. Twenty microliters of 10X standard solutions and diluted plasma samples were added to 180 μL of reduction buffer containing both ISs. Final concentrations of AB, DTT, and ISs were 50 mM, 5 mM, and 180 nM, respectively. The final concentrations of standard solutions were from 500 to 5 nM and from 2000 to 20 nM for LFLEPTQADIALLK and GTYSTTVTGR,

respectively. Samples were reduced for 30 minutes at 60 °C then alkylated with 2 µL of fresh IA solution (1 M in 1 M NaOH) for 60 minutes at room temperature (protected from light). Samples were digested overnight with 10 µL of trypsin solution (0.1 mg/ml in 1 mM HCl), and 10 µL of 20% formic acid were added to stop the reaction and to precipitate the SDC. Samples were centrifuged for 15 minutes at 20,000 g, 4 °C and 180 µL of supernatants were transferred to LC vials for LC-MS/MS analyses.

**Sample preparation for Apo(a) kinetic measurements in lipoprotein fractions** – To recover the major Lp(a) particles, 100 µL of LDL and HDL lipoprotein fractions were combined (7) and desalted and concentrated with 3 mL of 50 mM AB buffer (pH 8) and a 5-kDa molecular weight cut-off filter. Concentrated samples (100 µL) were mixed with 88 µL of 50 mM AB buffer (pH 8), 10 µL of 10% SDC, and 2 µL of 500 mM DTT and reduced at 60 °C for 30 minutes. Samples were then treated as described in the previous section. LFLEPTQADIALLK and [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]L-FLEPTQADIALLK synthetic peptides were dissolved in a water/acetonitrile mixture (50/50, v/v) containing 0.1% formic acid to reach a final concentration of 500 nM. To evaluate accuracy, labeled peptide solution was diluted in unlabeled peptide solutions to reach theoretical enrichments ranging from 0 to 5% (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 5.0%, n = 6/point). Control samples were prepared with the same method at 2% enrichment and for concentrations of 500, 250, 100, 50, 20 and 10 nM (n = 6/point).

**Analytical parameters** – Analyses were performed on an LC-MS/MS system consisting of a Xevo<sup>®</sup> Triple-Quadrupole mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) interface and an Acquity H-Class<sup>®</sup> UPLC<sup>™</sup> device (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Data acquisition and analyses were performed using MassLynx<sup>®</sup> and TargetLynx<sup>®</sup> software, respectively (version 4.1, Waters Corporation, Milford, MA, USA). Labeled and unlabeled peptides were separated on an Acquity<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column (2.1 × 100 mm, 1.7 µm, Waters) at 60 °C with a linear gradient of mobile phase B (acetonitrile containing 0.1% formic acid) in mobile phase A (5% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid) and at a flow rate of 600 µL/min. Mobile phase B was linearly increased from 1 to 50% for 5 minutes, kept constant for 1 min, returned to the initial condition in 1 min, and kept constant for 1 min before the next injection. Ten microliters of each sample were injected into the LC column. Labeled and unlabeled peptides were then detected by the mass spectrometer equipped with an ESI interface operating in the positive ion mode. The multiple reaction monitoring (MRM) mode was applied for MS/MS detection. Selected MRM transitions, cone voltages, and collision energies are described in **Supplemental Table I** (supplemental material). Note that each precursor ion was detected as a doubly charged ion leading to the formation of singly charged product ions ( $y_{10}^+$  for LFLEPTQADIALLK and labeled analogues and  $y_7^+$  for GTYSTTVTGR and labeled analogue).

**Supplemental Table I.** Mass spectrometry parameters for peptide detection.

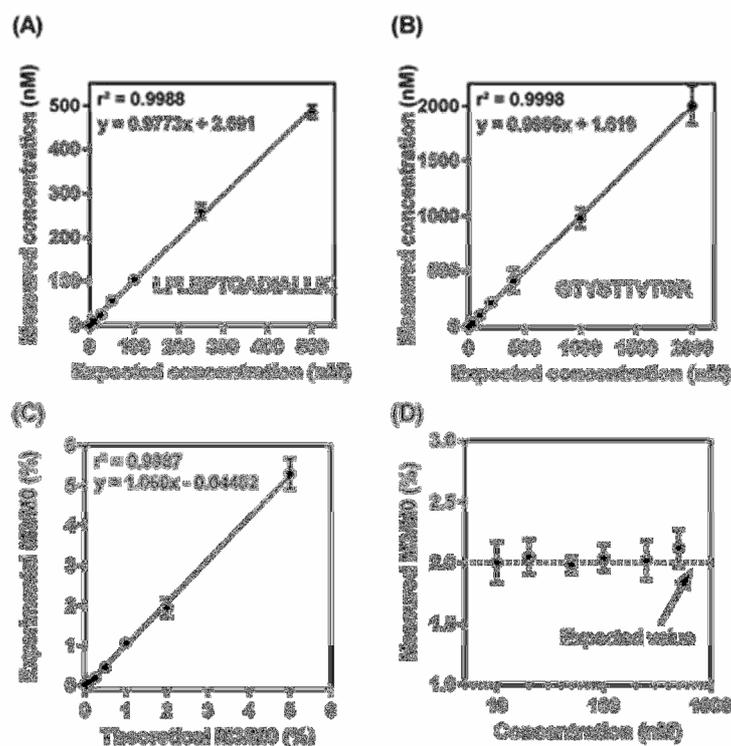
Peptide	Fragment	Cone/collision (V)	MRM transition (m/z)	RT (min)
LFLEPTQADIALLK	PTQADIALLK	55/27	786.9>1069.7	3.6
LFLEPTQADIALLK	PTQADIALLK	55/27	790.8>1077.7	3.6
<b>LFLEPTQADIALLK</b>	PTQADIALLK	55/27	788.4>1069.7	3.6
LFLEPTQADIALLK	PTQADIALLK	55/27	788.4>1069.7	3.6
LFLEPTQADIALLK	PTQADIALLK	55/27	788.4>1072.7	3.6
LFLEPTQADIALLK	PTQADIALLK	55/27	788.4>1072.7	3.6
GTYSTTVTGR	STTVTGR	35/22	522.0>721.6	1.4
GTYSTTVTGR	STTVTGR	35/22	527.2>731.4	1.4

Bold indicates the labeled amino acid (i.e., [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>]K, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>]R, or [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]L. RT: retention time

**Apo(a) data management** – Chromatographic peak area ratios between target peptides and their respective ISs constituted detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves for quantification of both peptides (**Supplemental Figure I** in supplemental material). A linear regression model was used for peptide quantification (7 concentration levels, n = 6), and the linearity of the method was confirmed (r<sup>2</sup> at 0.9988 and 0.9998 for LFLEPTQADIALLK and GTYSTTVTGR, respectively). Each plasma sample was assayed three times, and the coefficients of variation did not exceed 6.8% and 12.7% for LFLEPTQADIALLK and GTYSTTVTGR, respectively. As targeted peptide LFLEPTQADIALLK is unique in Apo(a), 1 mole of Apo(a) was assumed to be equal to 1 mole of this peptide. As the target peptide GTYSTTVTGR is repeated in the kringle IV<sub>1</sub>, IV<sub>2</sub>, IV<sub>3</sub> and IV<sub>5</sub> regions but not in the IV<sub>4</sub>, IV<sub>6</sub>, IV<sub>7</sub>, IV<sub>8</sub>, IV<sub>9</sub> and IV<sub>10</sub> regions, the total number of kringle IV was equal to (([GTYSTTVTGR]/[LFLEPTQADIALLK]) + 6) taking into account that the result expressed the average Apo(a) size of the two circulating isoforms. For Apo(a) enrichment measurements, M3/M0 ratios were calculated using chromatographic peak areas; M3 corresponded to the [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-Leucine labeled peptide and M0 to the unlabeled peptide. As the selected peptide contains 4 Leucines and 4 isotopomers of M3 can be formed (**Supplemental Table I**), the sum of MRM transitions used for the M3 detection allowed detection of all the isotopomers. Thus, M3/M0 ratios measured in biological samples were corrected by dividing the primary result by 4, as described by Brunengraber et al. (9). Correction was not applied in standard enrichment samples prepared with one standard isotopomer (**Supplemental Figure I**). Agreement was observed at 500 nM between the measured and expected ratio of [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-Leucine labeled peptide (M3) and unlabeled peptide (M0) over seven enrichment levels (n = 6). The slope and r<sup>2</sup> of the linear regression were 0.9987 and 1.06, respectively. To gain confidence in the ratio measurements, a theoretical enrichment at 2% was

performed over six distinct concentrations of LFLEPTQADIALLK (n = 6). No significant variation was observed from 10 to 500 nM. The coefficients of variation calculated over the six replicates did not exceed 8.3%, and the mean difference calculated between theoretical and measured enrichments was below 6.0%.

**Supplemental Figure I.** (A) Calibration curves used for Apo(a) quantification. (B) Calibration curves used for Apo(a) average size characterization. (C) Linearity of M3/M0 measurements at 500 nM for theoretical enrichments ranging from 0.1 to 5.0%. (D) Accuracy of enrichment assay (2%) for Apo(a) concentrations ranging from 10 to 500 nM. Values are mean  $\pm$  SD. M3: [5,5,5- $^2\text{H}_3$ ]-L-Leucine labeled peptide, M0: unlabeled peptide.



**Apo(a) and ApoB100 kinetic modeling** – Apo(a) fractional catabolic rate (FCR) was estimated on the 14 hour samples and using the SAAM II modeling program (Epsilon Group, Charlottesville, VA, USA) and fitting a mono exponential curve (mono compartmental model), as suggested for proteins with slow turnover rates (8). Apo(a) was assumed to have the corresponding VLDL-ApoB100 leucine plateau enrichment as a precursor pool. According to this steady state model, the FCR was considered equivalent to the fractional synthetic rate (FSR). Kinetic parameters of VLDL and LDL ApoB100 were calculated from the same plasma samples and using a three compartmental model as described previously for a 14 hours of a tracer constant infusion (3). Individual kinetic data are shown in **supplemental Table II**.

**Supplemental Table II.** Individual kinetic parameters of Apo(a) and ApoB100.

Patients	Lp(a)-Apo(a)		VLDL-ApoB100		LDL-ApoB100	
	FCR	PR	FCR	PR	FCR	PR
<b>Placebo</b>						
#1	0.70	1.7	8.90	25.6	0.40	6.6
#2	0.80	1.7	5.62	26.0	0.43	15.3
#3	0.45	1.3	1.90	14.6	0.16	6.1
#4	0.19	0.4	10.87	30.8	0.33	10.9
#5	0.19	0.4	4.66	19.5	0.39	6.7
#6	0.60	1.4	3.72	11.6	0.22	6.0
#7	0.70	2.7	3.85	21.5	0.26	5.2
#8	0.97	1.8	7.18	35.5	0.28	5.5
Mean	0.58	1.4	5.84	23.1	0.31	7.8
SD	0.28	0.8	2.97	8.0	0.09	3.5
<b>Niacin</b>						
#1	0.34	0.7	10.80	16.5	0.49	3.5
#2	0.49	0.6	3.46	10.0	0.43	12.5
#3	0.17	0.4	2.98	17.5	0.17	4.9
#4	0.15	0.3	4.80	13.8	0.41	13.8
#5	0.18	0.3	6.05	26.2	0.41	6.6
#6	0.43	0.8	4.22	12.9	0.33	6.3
#7	0.46	1.6	4.48	25.2	0.26	5.7
#8	0.67	1.0	3.34	11.0	0.27	6.1
Mean	0.36	0.7	5.02	16.6	0.35	7.4
SD	0.19	0.4	2.53	6.1	0.11	3.7
<b>p value</b>	0.008	0.008	0.742	0.313	0.031*	0.844

FCR: fractional catabolic rate (pool/day), PR: production rate (nmol/kg/day for Apo(a), and mg/kg/day for ApoB100), SD: standard deviation. Nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank test, \*one-tailed

**Statistical analyses** – Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 6.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) using the nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences between ERN and placebo treatment were considered statistically significant at  $p < 0.05$  (two-tailed or otherwise specified).

## REFERENCES

1. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb.* **2005**;12:295-300.
2. McCormack PL, Keating GM. Prolonged-release nicotinic acid: a review of its use in the treatment of dyslipidaemia. *Drugs.* **2005**;65:2719-2740.
3. Maugeais C, Ouguerram K, Krempf M, Maugeais P, Gardette J, Bigot E, Magot T. A minimal model using stable isotopes to study the metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. *Diabetes Metab.* **1996**;22:57-63
4. Bailhache E, Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest.* **2004**;34:527-534.
5. Beghin L, Duhal N, Poulain P, Hauw P, Lacroix B, Lecerf JM, Bonte JP, Fruchart JC, Luc G. Measurement of apolipoprotein B concentration in plasma lipoproteins by combining selective precipitation and mass spectrometry. *J Lipid Res.* **2000**;41:1172-1176.
6. Blond E, Rieusset J, Alligier M et.al. Nicotinic acid effects on insulin sensitivity and hepatic lipid metabolism: an in vivo to in vitro study. *Horm Metab Res.* 2014;46: 390-396.
7. Lassman ME, McLaughlin TM, Zhou H, Pan Y, Marcovina SM, Laterza O, Roddy TP. Simultaneous quantitation and size characterization of apolipoprotein(a) by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2014**;28:1101-1106.
8. Zhou H, Castro-Perez J, Lassman ME et.al. Measurement of apo(a) kinetics in human subjects using a microfluidic device with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2013**;27:1294-1302.6.
9. Brunengraber H, Kelleher JK, Des Rosiers C. Applications of mass isotopomer analysis to nutrition research. *Annu Rev Nutr.* **1997**;17:559-596.



## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Cette étude a permis de démontrer la puissance de la LC-MS/MS pour l'analyse cinétique de protéines complexes telles que l'apo(a). Notre méthode s'est révélée efficace pour sa caractérisation, qui reste difficile avec les méthodes conventionnelles, et nous l'avons validée d'un point de vue analytique. Nous avons été en mesure de simultanément quantifier l'apo(a) plasmatique, d'évaluer le nombre de Kringle IV<sub>2</sub> et de mesurer les cinétiques d'incorporation de notre traceur. Par ailleurs, nous avons comparé nos résultats à la méthode ELISA de référence utilisée pour la quantification de la Lp(a) lors d'un projet collaboratif parallèle (Alonso *et al.* 2016 ; Annexe B). Une excellente corrélation ( $r = 0,85$  ;  $p < 0,001$ ) a été trouvée entre les concentrations plasmatiques d'apo(a) mesurées par LC-MS/MS et les concentrations plasmatiques de Lp(a) mesurées par ELISA, validant définitivement notre démarche.

D'un point de vu physiologique, notre méthode est adaptée à l'étude statique et dynamique de l'apo(a) chez des patients hypertriglycéridémiques présentant des concentrations basales relativement peu élevées en apo(a). Nous avons ainsi vérifié que l'acide nicotinique diminuait les concentrations d'apo(a) de 20 %. Nous avons également montré que cette diminution modérée est très probablement la conséquence d'une forte baisse de la production d'apo(a) (-50 %) partiellement compensée par une réduction modérée de son catabolisme (-37 %). Nous avons utilisé une modélisation mono-exponentielle rudimentaire étant donné le nombre limité de données disponibles. Néanmoins, nos résultats cinétiques sont en adéquation avec ceux obtenus par d'autres équipes utilisant les méthodes d'analyse standards (électrophorèse et GC-MS) et une modélisation plus élaborée à plusieurs compartiments (Frischmann *et al.* 2007 ; Ooi *et al.* 2015). Après la publication de nos travaux, l'action de l'acide nicotinique sur la production d'apo(a) a été confirmée chez des patients diabétiques également traités avec une statine (Ooi *et al.* 2015).

Quelques limites sont à apporter. Nos patients n'ont pas été enrôlés en fonction de leurs niveaux de Lp(a). En conséquence, ces derniers présentaient des taux modérés et nous pouvons émettre l'hypothèse que nos observations auraient pu être différentes ou plus marquées chez des patients à hauts niveaux de Lp(a). De plus, nous n'avons pas pu établir d'association entre les cinétiques apo(a) et celles de l'apoB100 des particules Lp(a). En effet, nos fractions lipoprotéiques ont été isolées par ultracentrifugations en considérant que la gamme de densité de la Lp(a) se situe entre celle des LDL et des HDL. Dans nos fractions, les

cinétiques apoB100 sont donc le reflet du mélange apoB100-LDL et apoB100-Lp(a). L'association entre cinétiques apoB100-Lp(a) et apo(a)-Lp(a) est primordiale pour évaluer dans quelle mesure les altérations métaboliques de la Lp(a) sont liées directement à la production hépatique de l'apo(a) ou à l'assemblage de l'apo(a) aux LDL ([Frischmann \*et al.\* 2007](#)). L'isolement spécifique de la Lp(a) (par immuno-précipitation) des autres lipoprotéines plasmatiques fera donc l'objet d'une attention particulière dans de prochaines études cinétiques humaines. Une dernière limite est de ne pas pouvoir établir le profil polymorphique exact chez les patients hétérozygotes présentant deux isoformes circulantes. En effet, la taille polymorphique mesurée par LC-MS/MS ne reflète que l'état médian du patient. Seul une parfaite séparation des isoformes en amont de l'analyse LC-MS/MS (électrophorèse) pourra corriger ce point.

## Article 2

### **PCSK9 inhibition with Alirocumab efficiently reduces lipoprotein (a) levels in non-human primates by lowering apolipoprotein (a) production rate**

Croyal M, Tran TTT, Blanchard RH, Le Bail JC, Villard EF, Poirier B, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Ramin-Mangata S, Bourane S, Thedrez A, Krempf M, Boixel C, Lambert G, and Guillot E

Soumis le 16 mai 2017 au Journal *Circulation Research*

PCSK9 est un inhibiteur naturel du LDLR et plusieurs essais cliniques ont montré que son inhibition par des anticorps monoclonaux (Alirocumab, Evolocumab) permet de réduire les taux de LDL-C (Lambert *et al.* 2017 ; Annexe B), mais également les concentrations plasmatiques de la Lp(a). Plusieurs études ont donc tenté de comprendre les mécanismes sous-jacents à ce phénomène. Certaines ont montré une implication spécifique du LDLR dans le catabolisme de la Lp(a) (Romagnuolo *et al.* 2015) alors que les statines, également connues pour améliorer la fonction du LDLR, ne réduisent pas les concentrations circulantes de Lp(a). Plus récemment, une autre étude *in vitro* a démontré le rôle du récepteur au plasminogène dans l'internalisation de la Lp(a) (Sharma *et al.* 2017). Lors de nos précédents travaux (Villard *et al.* 2016 ; Annexe B), nous avons montré que la captation cellulaire de la Lp(a) dépendait d'une voie indépendante du LDLR et que la sécrétion d'apo(a) était fortement augmentée par PCSK9 *in vitro*. Cet effet étant annulé par l'Alirocumab, nos travaux ont suggéré un rôle de PCSK9 dans la production de la Lp(a).

Nous avons donc souhaité conforter nos hypothèses en réalisant une étude cinétique *in vivo* à l'aide de la  $^2\text{H}_3$ -leucine comme traceur endogène. Cette étude a été réalisée en cross-over Alirocumab *versus* placebo chez le singe, l'une des rares espèces animales produisant de la Lp(a). Après modélisation des courbes cinétiques obtenues par LC-MS/MS, nous avons constaté une baisse significative de la concentration plasmatique d'apo(a) (-53 %) ainsi que de son taux de production absolue (-51 %). Aucune différence significative n'a été mesurée sur la vitesse de catabolisme. Ces résultats cinétiques *in vivo* sont en adéquation avec nos hypothèses de départ. L'inhibition de PCSK9 par l'Alirocumab réduit la production d'apo(a), et par conséquent de la Lp(a), sans agir de façon significative sur son catabolisme.



## **PCSK9 inhibition with alirocumab efficiently reduces lipoprotein (a) levels in non-human primates by lowering apolipoprotein (a) production rate.**

**Authors:** Mikaël Croyal, PhD<sup>1</sup>, Thi-Thu-Trang Tran, PhD<sup>2</sup>, Rose Hélène Blanchard, MSc<sup>3</sup>, Jean-Christophe Le Bail, PhD<sup>2</sup>, Elise F. Villard, PhD<sup>2</sup>, Bruno Poirier PhD<sup>2</sup>, Audrey Aguessse, MSc<sup>1</sup>, Stéphane Billon-Crossouard, MSc<sup>1</sup>, Stéphane Ramin-Mangata, MSc<sup>4</sup>, Valentin Blanchard, MSc<sup>1</sup>, Tim Hollstein, MD<sup>5</sup>, Aurélie Thedrez, PhD<sup>1</sup>, Philip Janiak, MD<sup>2</sup>, Michel Krempf, MD-PhD<sup>1</sup>, Christophe Boixel, PhD<sup>3</sup>, Gilles Lambert, PhD<sup>4</sup>, and Etienne Guillot, PhD<sup>2</sup>.

**Affiliations:** <sup>1</sup>Université de Nantes, INRA, UMR 1280 PhAN, Nantes, France; <sup>2</sup>Sanofi R&D, Chilly-Mazarin, France; <sup>3</sup>Sanofi R&D, Alfortville, France; <sup>4</sup>Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 D ETROI, Sainte-Clotilde, France ; <sup>5</sup>Interdisziplin ares Stoffwechsel Centrum Arbeitsbereich Lipidstoffwechsel, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, Germany.

**Short Title -** PCSK9 inhibition reduces Lp(a) production *in vivo*

**Corresponding Author:** Pr. Gilles Lambert, Inserm UMR 1188, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France. Tel: + 262 692 437 708; Fax: +262 262 938 237; E-mail: [gilles.lambert@univ-reunion.fr](mailto:gilles.lambert@univ-reunion.fr)

**Total word count:** 3590

**Subject Codes :** Metabolism, Lipids and cholesterol

**ABSTRACT**

**Rationale** - Therapeutic antibodies targeting PCSK9 (e.g. alirocumab) efficiently lower low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and lipoprotein (a) [Lp(a)] levels in clinical trials. The mechanisms by which PCSK9 modulates Lp(a) metabolism remain controversial. We recently showed that PCSK9 enhances apolipoprotein (a) [apo(a)] secretion from primary human hepatocytes without altering Lp(a) cellular uptake.

**Objectives** - We aimed to determine if PCSK9 enhances apo(a)/Lp(a) hepatic production *in vivo*.

**Methods and Results** - Six non-human primates (NHP) were treated with alirocumab or a control IgG1 antibody in a crossover protocol. When lipids reached steady state, NHP received an intravenous bolus injection of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine, and blood samples were collected sequentially over 48 hours. Enrichment of apo(a) in [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine was assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Kinetic parameters were calculated using a mono-exponential model with the SAAMII software. Compared with IgG1 treatment, alirocumab efficiently blocked circulating PCSK9 and significantly reduced total cholesterol (TC) by 28%, LDL-C by 67%, Lp(a) by 56%, apolipoprotein B100 (apoB100) by 53%, apo(a) by 53% and apolipoprotein E (apoE) by 60%. Enrichment of apo(a) in [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine was maximal 2 to 3 hours after bolus injection and returned to baseline 5 to 6 hours later. Alirocumab did not significantly alter the fractional catabolic rate (FCR) of apo(a) [0.41±0.09 vs. 0.40±0.07 pool/day] but sharply and significantly reduced the production rate (PR) of apo(a) [0.81±0.24 vs. 1.64±0.46 nmol/kg/day], compared with IgG1.

**Conclusion** - In line with the observations made in human hepatocytes, the present kinetic study establishes that PCSK9 neutralization with alirocumab efficiently reduces circulating Lp(a) levels primarily by lowering apo(a) hepatic production *in vivo*.

**Key Words** - PCSK9, lipoprotein (a), LDL receptor.

**Abbreviations:**

apo(a), apolipoprotein (a)

apoA-I, apolipoprotein A-I

apoB100, apolipoprotein B100

apoE, apolipoprotein E

FCR, fractional catabolic rate

FH, familial hypercholesterolemia

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol

LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol

LDLR, low-density lipoprotein receptor

Lp(a), lipoprotein (a)

mAbs, monoclonal antibodies

NHP, non-human primates

PCSK9, Proprotein convertase subtilisin kexin type 9

PR, production rate

TC, total cholesterol

TG, triglycerides

## INTRODUCTION

Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 (PCSK9) is a circulating inhibitor of the low-density lipoprotein receptor (LDLR). It binds to the LDLR and after endocytosis targets the LDLR that would otherwise recycle back to the cell surface, toward lysosomal degradation<sup>1,2</sup>. PCSK9 inhibition with monoclonal antibodies (mAbs), used alone or in combination with statins, sharply reduces circulating low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in humans. Like statins, anti-PCSK9 mAbs increase the abundance of LDLR at the surface of hepatocytes and thereby promote an accelerated clearance of circulating LDL particles, thus lowering LDL-C levels. However, in contrast to statins, inhibiting PCSK9 with mAbs also promotes a reduction in lipoprotein (a) [Lp(a)] serum levels<sup>3</sup>.

Lp(a) consists of a unique protein structurally similar to plasminogen, apolipoprotein (a) [apo(a)], expressed almost exclusively by the liver and covalently tethered to the apolipoprotein B100 (apoB100) moiety of an LDL particle by a unique disulfide bond<sup>4</sup>. There is strong epidemiological evidence that Lp(a) is highly atherogenic, as elevated Lp(a) levels are independently associated with cardiovascular diseases risk<sup>5</sup>. It is widely accepted that circulating Lp(a) concentrations are primarily controlled by synthesis rather than catabolism, but the molecular and cellular mechanisms governing apo(a)/Lp(a) hepatic production as well as Lp(a) hepatic catabolism are still lacking<sup>3-5</sup>.

Initial studies trying to unravel the mechanisms of Lp(a) catabolism are contradictory. One report indicates that the LDLR is of minor importance, if any, for Lp(a) binding and subsequent internalization in human dermal fibroblasts. Lp(a) was shown by others to bind to fibroblasts only with a slightly reduced affinity compared with LDL, and to be internalized via the LDLR in those cells as well as in the HepG2 hepatoma cell line (reviewed in<sup>3</sup>). It has been proposed that PCSK9 inhibition with mAbs promotes a supra-physiological increase in LDLR expression at the hepatic surface thereby allowing Lp(a) uptake<sup>6</sup>. In sharp contrast with this study, we recently showed that Lp(a) cellular uptake was not mediated by the LDLR using (i) dermal fibroblasts isolated from controls, heterozygous, and homozygous patients with familial hypercholesterolemia (FH) totally lacking the LDLR, as well as (ii) human primary hepatocytes<sup>7</sup>. Alirocumab did not modulate Lp(a) uptake in those cells<sup>7</sup>. Our results are concordant with the observations that upregulating LDLR expression, even with the most potent statins, does not reduce Lp(a) levels *in vivo*<sup>8</sup>, and that PCSK9 inhibition with evolocumab can lower Lp(a) in homozygous FH patients totally lacking the LDLR<sup>9</sup>. In addition, we showed that PCSK9 can enhance the secretion of apo(a) from human primary hepatocytes, an effect that was fully reversed by alirocumab<sup>7</sup>. It appears difficult to explain, beyond differences in methodologies, how and why those *in vitro* studies yield opposite conclusions on the potential mechanism(s) by which PCSK9 neutralization with mAbs reduces Lp(a) levels *in vivo*.

In order to establish whether PCSK9 neutralization physiologically modulates the catabolism (i.e. uptake and degradation) and/or the production (i.e. synthesis, secretion, and assembly) of Lp(a) *in*

*in vivo*, we performed a series of apo(a) kinetic studies in non-human primates (NHP) treated with alirocumab or placebo. We now demonstrate that alirocumab reduces circulating Lp(a) levels primarily by lowering apo(a) production rate (PR) *in vivo*.

## METHODS

**Animals and treatments** - Four males and two females NHP (*Macaca fascicularis*) (Noveprim Ltd., Mahébourg, Mauritius), 5-6 years old weighting 8.9 to 9.3 kg were infused subcutaneously with alirocumab or IgG1 control (Regeneron, Tarrytown, NY, USA) (10 mg/kg) in a crossover protocol including a 7 weeks wash-out period. Three days after treatment, when serum lipids reached steady-state, fasted NHP received an intravenous bolus injection of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine (40  $\mu$ mol/kg) (Euriso-Top, Saclay, France). Blood samples (2 mL) were collected before mAb injection and sequentially over 48 hours after [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine injection in dry tubes, spun at 3000g for 10 min at 4°C and serum aliquots were stored at -80°C until use. Animals were fed a SAFE/UAR 107C Certified Primate Diet (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France) in the morning and fruits and vegetables in the evening with water *ad libitum*. This study was performed in agreement with EU directives for the standard of care and use of laboratory animals and approved by the animal care and use committee of Sanofi R&D.

**Determination of serum lipids, lipoprotein, apolipoproteins and kinetic parameters** - See the online supplement.

**Statistical analyses** - Results are expressed as mean  $\pm$  standard error to the mean (SEM). To evaluate the treatment effect, a two-way repeated measures analysis of variance with factors group and session was performed on log-transformed absolute PR values. A three-way repeated measures analysis of variance with factors group, session and day was performed on log-transformed data for Lp(a) and apo(a) parameters, and on raw data for all other parameters. NHP and NHP\*session random effects have been added. When the interaction “Group\*Day” or the factor “Group” was significant, a Winer test was performed to compare the alirocumab group to the IgG1 group on the studied parameter at each time point. Significance level was set to 5%, except for the interaction for which the significance level was 10%. Statistical analyses were performed with the SAS9.4 software.

## RESULTS

We initially determined in a pilot study conducted in 2 NHP (one male and one female) that alirocumab reduced Lp(a) by 58% as early as three days after treatment and that this effect was maintained at least for 14 days (data not shown). We accordingly designed a crossover protocol fully described in the method section, by selecting six NHP with baseline Lp(a) and apo(a) serum concentrations above 20 mg/dL and 40 nmol/L, respectively, to allow reliable measurements of Lp(a) levels by immuno-turbidimetry and of apo(a) enrichment in [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), in particular after alirocumab treatment.

We therefore treated six NHP in this crossover protocol with 10 mg/kg (subcutaneously) of alirocumab and of a control IgG1 antibody, sequentially. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins concentrations were systematically measured in serum samples collected before (day 0) and at day 3, 4 and 5 after treatment with the antibodies. As anticipated, treatment with the control IgG1 antibody did not significantly affect circulating serum lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in these animals (**Table 1 and Figure 1**). A 10-fold increase in total circulating PCSK9 levels was observed 3 days post alirocumab vs. IgG1 treatment due to plasma PCSK9 neutralization (**Table 1**). Compared with IgG1 treatment, alirocumab significantly reduced serum total cholesterol (TC) (-28%), LDL-C (-67%), and Lp(a) (-56%) at day 3 and similarly at days 4 and 5 post-treatment, but did not significantly alter triglycerides (TG) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels (**Table 1**). Likewise, alirocumab significantly reduced the serum concentrations of apoB100 (-53%), apo(a) (-53%), and apolipoprotein E (apoE) (-60%), (**Figure 1**), but not that of apolipoprotein A-I (apoA-I) (not shown).

We further assessed the effects of PCSK9 inhibition on the distribution of cholesterol, apoB100 and apo(a) in the lipoproteins of NHP by FPLC using serum samples collected 3 days post alirocumab or IgG1 injections. Compared with IgG1, alirocumab treatment reduced the cholesterol content of LDL sized lipoproteins (**Figure 2**). The apoB100 content of the eluted LDL fractions followed accordingly. Likewise, the apo(a) content was markedly reduced within the same fractions range by alirocumab treatment (**Figure 2**).

Prior to assess the kinetic parameters of a serum protein such as apo(a) with stable isotopes, it is essential to verify that circulating concentrations of this protein are stable throughout. We therefore ascertained that serum levels of apo(a) had reached steady-state for the duration of the kinetic study between day 3 and day 5 post treatment with alirocumab or IgG1 (**Supplemental Figure 1**). In our experimental conditions, circulating apo(a) levels did not vary by more than 10% around the mean value calculated for each NHP, indicating that steady-state had been reached for apo(a) from day 3 to day 5 post alirocumab or IgG1 injections. The animals received a bolus injection of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine tracer at day 3 in the morning and serum samples were collected sequentially over 48 hours. We measured the enrichment in [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine of apo(a) in those samples. As shown in **Figure 3A**, apo(a)

enrichment was maximal 2 to 3 hours after injection and returned to baseline 5 to 6 hours later. We did not detect any [ $^2\text{H}_3$ ]-leucine enrichment of apo(a) in the samples collected more than 6 hours after tracer injection (i.e. at the 9h, 24h and 48h time points). Compared with IgG1 treatment, alirocumab did not significantly affect the mean incorporation of [ $^2\text{H}_3$ ]-leucine in apo(a) (**Figure 3A**). As a result, the fractional catabolic rate (FCR) of apo(a) was similar in NHP treated with alirocumab ( $0.41\pm 0.09$  pool/day) compared with IgG1 control treatment ( $0.40\pm 0.07$  pool/day) (**Figure 3B**). In contrast, alirocumab significantly reduced the PR of apo(a) by 51%, at  $0.81\pm 0.24$  nmol/kg/day compared with  $1.64\pm 0.46$  nmol/kg/day for the IgG1 control treatment ( $p=0.0008$ ) (**Figure 3B**).

We performed an additional experiment on two of those animals (one female received alirocumab and one male received the IgG1 placebo) two months after completion of the initial crossover protocol. In the animal infused with IgG1, apo(a) FCRs were found similar at 0.567 and 0.509 pools/day. Apo(a) PR were also found similar at 1.15 and 1.13 nmol/kg/day, two months apart. In the female infused twice with alirocumab, apo(a) FCRs were found similar at 0.372 and 0.376 pools/day. Apo(a) PR were also found similar at 0.61 and 0.65 nmol/kg/day, two months apart. This validates the reproducibility of apo(a) kinetics measurements in the NHP animal model.

## DISCUSSION

In this study we showed that PCSK9 neutralization with alirocumab efficiently reduces circulating Lp(a) levels in NHP, primarily by lowering apo(a) hepatic PR. This result is in line with our previous study showing that PCSK9 enhances the secretion of apo(a) from human primary hepatocytes<sup>7</sup>. It appears difficult to elucidate the molecular mechanism by which PCSK9 modulates Lp(a) production, since even the site of Lp(a) assembly has not been confirmed (within hepatocytes, the space of Disse, or the plasma compartment?)<sup>5</sup>. At that point we can only speculate that PCSK9, which associates with LDL particles in the serum<sup>10, 11</sup>, might enhance the ability of LDL particles to serve as substrates for Lp(a) formation. We can also speculate that PCSK9-mediated degradation of the LDLR might indirectly alter the secretion of apo(a), since the LDLR appears to modulate the secretion of nascent VLDL particles<sup>12</sup>, which has been shown to lower apo(a) secretion<sup>13</sup>.

However, the major result of our study, namely PCSK9 inhibition with alirocumab lowers apo(a) PR and does not affect apo(a) FCR, have not been observed in a recent study conducted in 18 human volunteers sequentially treated with placebo or alirocumab<sup>14</sup>. In that study, alirocumab reduced Lp(a) levels by 18.7% without significantly altering the PR of apo(a) (-9%,  $p=0.6$ ). In addition, there was a trend toward increased apo(a) FCR upon alirocumab treatment [from a median of 0.16 (0.13-0.23) to 0.20 (0.15-0.25) pool/day,  $p=0.09$ ]<sup>14</sup>. We do not have a clear explanation to those discrepancies, except that alirocumab reduced Lp(a) levels by 58% in NHPs compared with a reduction of 18.7% in

human volunteers<sup>14</sup>, and that Lp(a) was isolated by ultracentrifugation in the human study. In that respect, similar rates of production and clearance for both apo(a) and apoB100 within the same Lp(a) particles have been reported when Lp(a) is isolated by ultracentrifugation<sup>15</sup>. This is apparently different when Lp(a) is isolated directly from blood, in which case apo(a) from Lp(a) has a longer serum residence time than apoB100 from Lp(a)<sup>16, 17</sup>. Interestingly, it has recently been shown that, unlike apoB100, the apo(a) component of Lp(a) has the ability to get recycled (i.e. resecreted) following Lp(a) cellular uptake<sup>18</sup>.

In addition, we used a bolus injection of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine whereas a prime constant infusion of tracer was performed in the human study<sup>14</sup>. However, a recent study showed that bolus and prime constant infusion of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine in NHP yielded similar values in terms of apo(a) kinetic parameters<sup>19</sup>. These parameters (FCR, PR) were within the same range than those observed in our study. It is therefore unlikely that the mode of tracer administration (bolus /prime constant infusion) could explain the differences in terms of apo(a) kinetic parameters observed between the human study<sup>14</sup> and ours.

There are some potential limitations to our study. The first one is that we used cynomolgus monkeys, and monkeys usually present a higher prevalence of smaller apo(a) isoforms than humans<sup>20</sup>. The second limitation is that we treated these animals with alirocumab in monotherapy. Whether apo(a) PR is also reduced by alirocumab in combination with traditional lipid lowering medications, such as statins and ezetimibe, clearly remains to be established.

In line with previous observations made in primary human hepatocytes<sup>7</sup>, we conclude that PCSK9 neutralization with alirocumab in non-human primates efficiently reduces circulating Lp(a) levels, primarily by lowering apo(a) hepatic production *in vivo*.

## SOURCE OF FUNDING

This study was funded in part by Sanofi-Regeneron. GL is the recipient of an Allocation de Recherche Chaire-Mixte (Inserm-Université de La Réunion), and a Programme de Recherche Hospitalière en Santé ANR-16-RHUS-0007.

## DISCLOSURES

TTTT, RHB, JCL, EFV, PJ, CB and EG are full time employees of Sanofi. GL has received research funding and honoraria from Amgen Inc. and Sanofi-Regeneron.

## REFERENCES

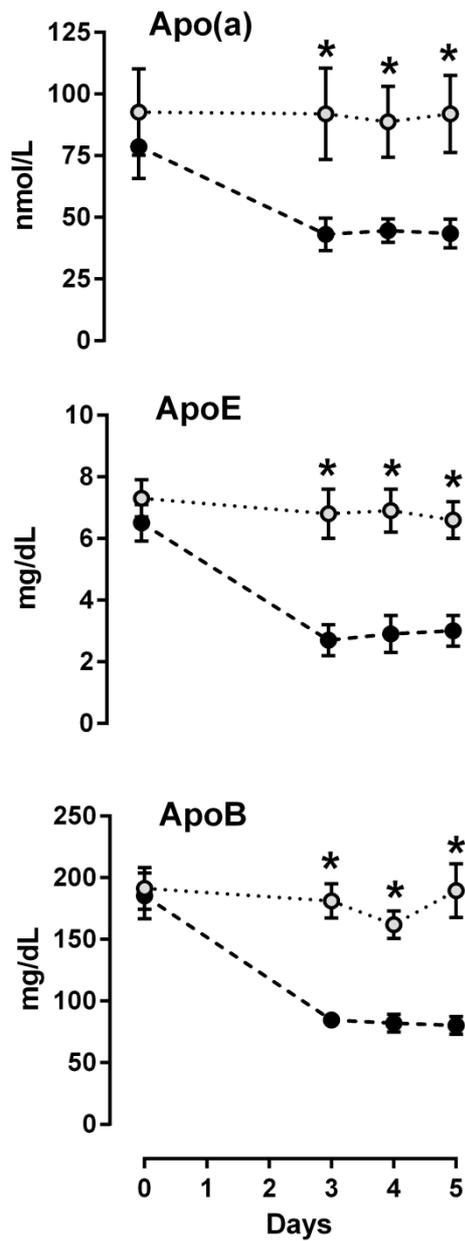
1. Marais AD, Kim JB, Wasserman SM and Lambert G. PCSK9 inhibition in LDL cholesterol reduction: genetics and therapeutic implications of very low plasma lipoprotein levels. *Pharmacol Ther.* 2015;145:58-66.
2. Seidah NG, Awan Z, Chretien M and Mbikay M. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circulation research.* 2014;114:1022-36.
3. Lambert G, Thedrez A, Croyal M, Ramin-Mangata S, Couret D, Diotel N, Nobecourt-Dupuy E, Krempf M, LeBail JC, Poirier B, Blankenstein J, Villard EF and Guillot E. The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies. *Clin Sci (Lond).* 2017;131:261-268.
4. Kronenberg F and Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med.* 2013;273:6-30.
5. Tsimikas S. A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies. *Journal of the American College of Cardiology.* 2017;69:692-711.
6. Romagnuolo R, Scipione CA, Boffa MB, Marcovina SM, Seidah NG and Koschinsky ML. Lipoprotein(a) catabolism is regulated by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 through the low density lipoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry.* 2015;290:11649-62.
7. Villard EF, Thedrez A, Blankenstein J, Croyal M, Tran TTT, Poirier B, LeBail JC, Illiano S, Nobécourt E, Krempf M, Blom DJ, Marais AD, Janiak P, Muslin AJ, Guillot E and Lambert G. PCSK9 modulates the secretion but not the cellular uptake of Lipoprotein (a) ex vivo: an effect blunted by alirocumab. *J Am Coll Cardiol Basic Transl Sci.* 2016;1:419-427.
8. Khera AV, Everett BM, Caulfield MP, Hantash FM, Wohlgemuth J, Ridker PM and Mora S. Lipoprotein(a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *Circulation.* 2014;129:635-42.
9. Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, Xu F, Scott R and Raal FJ. Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 2013;128:2113-20.
10. Tavori H, Giunzioni I, Linton MF and Fazio S. Loss of plasma proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) after lipoprotein apheresis. *Circulation research.* 2013;113:1290-5.
11. Tavori H, Christian D, Minnier J, Plubell D, Shapiro MD, Yeang C, Giunzioni I, Croyal M, Duell PB, Lambert G, Tsimikas S and Fazio S. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circulation research.* 2016;119:29-35.
12. Blasiolo DA, Oler AT and Attie AD. Regulation of ApoB secretion by the low density lipoprotein receptor requires exit from the endoplasmic reticulum and interaction with ApoE or ApoB. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283:11374-81.
13. Nassir F, Bonen DK and Davidson NO. Apolipoprotein(a) synthesis and secretion from hepatoma cells is coupled to triglyceride synthesis and secretion. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273:17793-800.
14. Reyes-Soffer G, Pavlyha M, Ngai C, Thomas T, Holleran S, Ramakrishnan R, Karmally W, Nandakumar R, Fontanez N, Obunike J, Marcovina SM, Lichtenstein AH, Matthan NR, Matta J, Maroccia M, Becue F, Poitiers F, Swanson B, Cowan L, Sasiela WJ, Surks HK and Ginsberg HN. Effects of PCSK9 Inhibition With Alirocumab on Lipoprotein Metabolism in Healthy Humans. *Circulation.* 2017;135:352-362.
15. Lamon-Fava S, Diffenderfer MR and Marcovina SM. Lipoprotein(a) metabolism. *Current opinion in lipidology.* 2014;25:189-93.
16. Diffenderfer MR, Lamon-Fava S, Marcovina SM, Barrett PH, Lel J, Dolnikowski GG, Berglund L and Schaefer EJ. Distinct metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein(a). *Metabolism.* 2016;65:381-90.
17. Jenner JL, Seman LJ, Millar JS, Lamon-Fava S, Welty FK, Dolnikowski GG, Marcovina SM, Lichtenstein AH, Barrett PH, deLuca C and Schaefer EJ. The metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein (a) in human beings. *Metabolism.* 2005;54:361-9.
18. Sharma M, Redpath GM, Williams MJ and McCormick SP. Recycling of Apolipoprotein(a) After PlgRKT-Mediated Endocytosis of Lipoprotein(a). *Circulation research.* 2016.

19. Xie F, Emery MG, Gibbs JP, Rock DA and Rock BM. SRM-based measurements of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and lipoprotein(a) kinetics in nonhuman primate serum. *Bioanalysis*. 2016;8:2551-2563.
20. Enkhmaa B, Abbuthalha A, Anuurad E, Zhang W, Tarantal AF and Berglund L. Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) lipoprotein(a) and apolipoprotein(a): high frequency of small size apolipoprotein(a) isoforms. *J Med Primatol*. 2015;44:117-24.

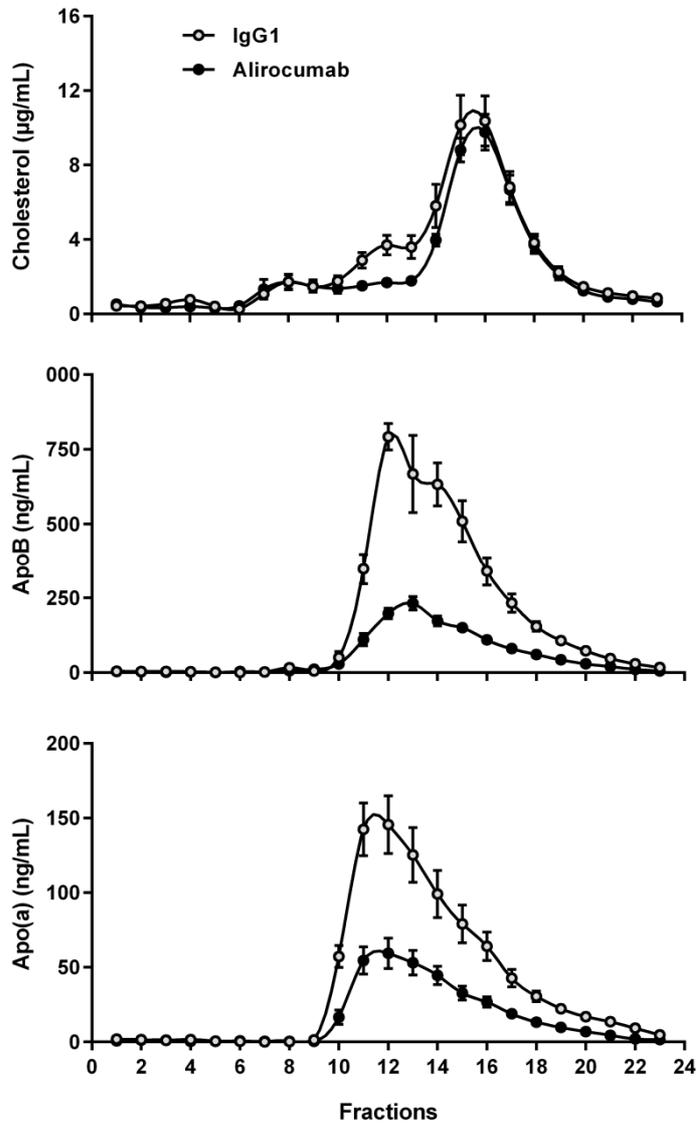
**Table 1 - Serum lipids, lipoproteins and PCSK9 in NHP treated with a control IgG1 antibody or alirocumab - Results are represented as mean  $\pm$  SEM (n=6). \*p<0.001 versus IgG1-treated group.**

	Treatment	Day 0	Day 3	Day 4	Day 5
<b>Total Cholesterol</b> (mmol/L)	<b>IgG1</b>	2.43 $\pm$ 0.22	2.27 $\pm$ 0.16	2.03 $\pm$ 0.14	2.04 $\pm$ 0.13
	<b>Aliro</b>	2.41 $\pm$ 0.26	1.64 $\pm$ 0.18*	1.39 $\pm$ 0.10*	1.31 $\pm$ 0.09*
<b>Triglycerides</b> (mmol/L)	<b>IgG1</b>	1.86 $\pm$ 0.56	1.35 $\pm$ 0.37	1.24 $\pm$ 0.25	1.31 $\pm$ 0.26
	<b>Aliro</b>	1.52 $\pm$ 0.60	1.52 $\pm$ 0.50	0.91 $\pm$ 0.19	1.12 $\pm$ 0.29
<b>HDL-C</b> (mmol/L)	<b>IgG1</b>	1.67 $\pm$ 0.19	1.52 $\pm$ 0.09	1.40 $\pm$ 0.17	1.25 $\pm$ 0.12
	<b>Aliro</b>	1.70 $\pm$ 0.11	1.51 $\pm$ 0.17	1.41 $\pm$ 0.10	1.27 $\pm$ 0.07
<b>LDL-C</b> (mmol/L)	<b>IgG1</b>	0.98 $\pm$ 0.09	0.85 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.05
	<b>Aliro</b>	1.00 $\pm$ 0.16	0.28 $\pm$ 0.05*	0.19 $\pm$ 0.04*	0.26 $\pm$ 0.05*
<b>Lp(a)</b> (mg/dL)	<b>IgG1</b>	30.6 $\pm$ 5.3	30.5 $\pm$ 4.7	31.2 $\pm$ 5.9	27.2 $\pm$ 5.4
	<b>Aliro</b>	27.6 $\pm$ 5.2	13.5 $\pm$ 2.5*	12.1 $\pm$ 1.9*	10.0 $\pm$ 1.3*
<b>Total PCSK9</b> (ng/mL)	<b>IgG1</b>	106 $\pm$ 31	66 $\pm$ 12	87 $\pm$ 19	95 $\pm$ 14
	<b>Aliro</b>	97 $\pm$ 20	704 $\pm$ 168*	597 $\pm$ 134*	741 $\pm$ 170*

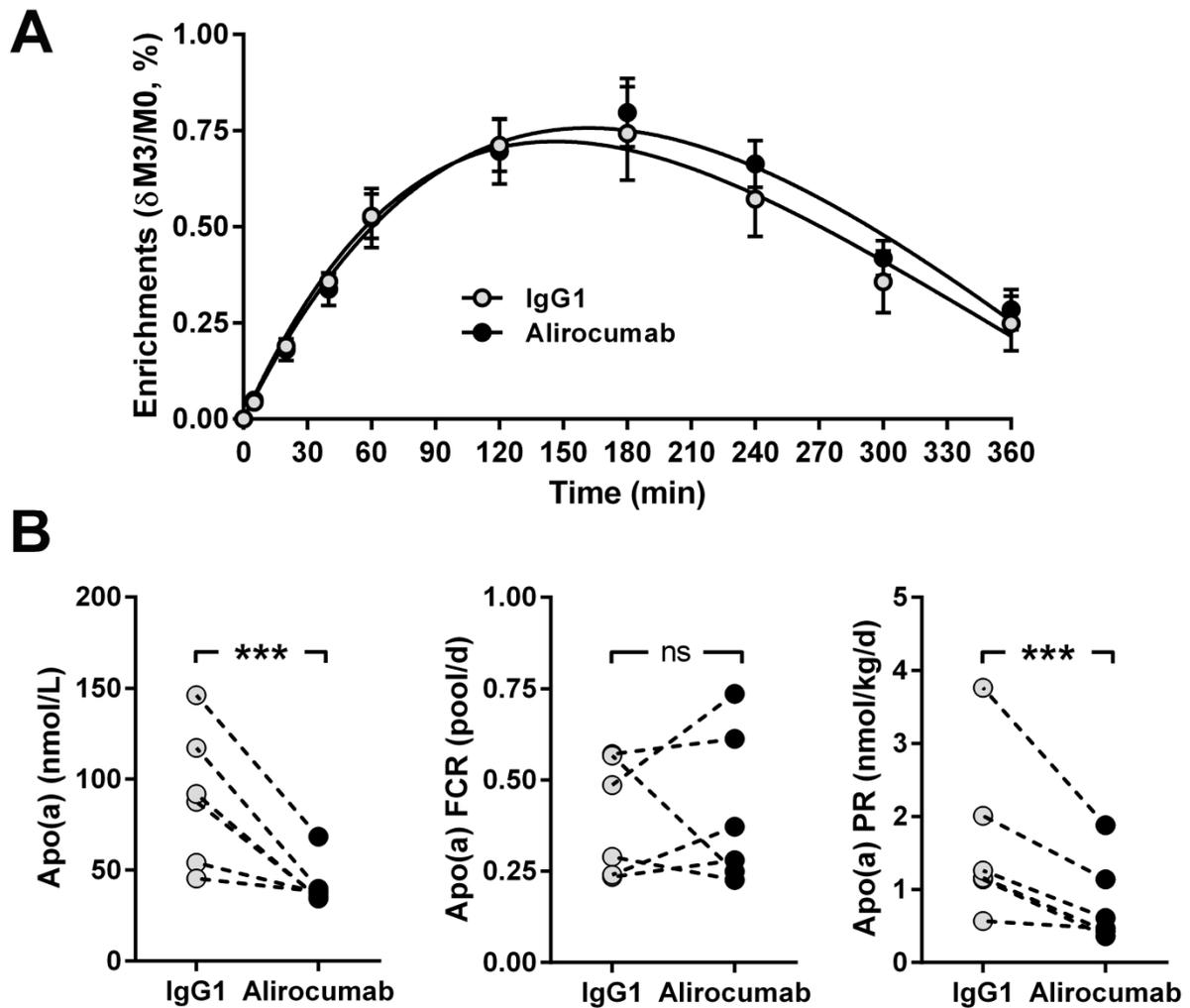
**Figure 1 - Serum apolipoproteins in NHP treated with a control IgG1 antibody (grey circles) or alirocumab (black circles) - Results are represented as mean  $\pm$  SEM (n=6). \*  $p < 0.001$  alirocumab vs. IgG1.**



**Figure 2 - Lipoprotein distribution of cholesterol, ApoB100 and apo(a) in the plasma of NHP treated with alirocumab or IgG1.** Results are represented as mean  $\pm$  SEM (n=6). VLDL, LDL and HDL peaks elute between fractions 6-9, 10-14, and 15-20, respectively.



**Figure 3 - Apo(a) kinetics in NHP treated with alirocumab or IgG1 – (A)** Enrichment in [ $^2\text{H}_3$ ]-leucine of apo(a) was monitored for the time course of the kinetic study. Results are represented as mean  $\pm$  SEM (n=6). **(B)** Apo(a) plasma concentration (left panel), fractional catabolic rates (middle panel), and production rate (right panel) in individual NHP upon alirocumab or IgG1 treatment. \*\*\* p<0.001 vs. IgG1. ns, not significant.



## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Serum lipids and lipoprotein analyses** - Serum samples were analyzed for total cholesterol (TC), triglycerides (TG), direct LDL-C and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) on a Pentra 400 biochemical analyzer (Horiba ABX, Montpellier, France) using standard colorimetric assays. Lp(a) levels were measured with an immuno-turbidimetric assay (Randox Lab, Crumlin, UK). ApoB100 and apolipoprotein A-I (ApoA-I) were measured by ELISA using the EA 7001-1 kit (Assaypro, St Charles, MO) and the 3710-1HP-2 kit (Mabtech, Cincinnati, OH), respectively. Total (free and bound) PCSK9 concentrations were determined using the Quantikine SPC900 ELISA (R&D Systems, Lille, France). Serum lipoproteins were resolved using a FPLC Äkta System by injecting 5  $\mu$ L of serum on a Superose™ 6 Increase 3.2/300 column (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) eluted at a constant flow rate of 40  $\mu$ L/min in PBS, 0.2 mM EDTA, pH 7.4. Cholesterol, apo(a) and apoB100 were measured in each eluted fraction (100  $\mu$ L) using an Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Lifetechnologies, Eugene, OR), the STA-359 sandwich ELISA kit (Cellbiolab Inc., St Diego, CA) and the EA 7001-1 ELISA kit (Assaypro), respectively. The distribution of cholesterol in the lipoprotein fractions was as follows: a VLDL peak eluting between fractions 6 and 9, an LDL peak eluting between fractions 10 and 14, and an HDL peak eluting between fractions 15 and 20, with expected overlaps, in particular of small LDL/large HDL between fractions 13 and 17.

**Quantification of serum apolipoproteins by LC-MS/MS** - All reagents were from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands), except synthetic peptides that were purchased from Thermo Scientific Biopolymers (Darmstadt, Germany). Apolipoproteins were quantified in serum samples using a validated assay involving trypsin proteolysis and the subsequent analysis of proteotypic peptides by LC-MS/MS. The method was slightly modified for apolipoprotein quantification in NHP serum. A pool solution of synthetic peptides was constituted and serially diluted in water to obtain 7 standard solutions into the ranges of 10-1000 nM for apoE and 5-500 nM for apo(a). Serum and standard samples (50  $\mu$ L) were then reduced, alkylated and trypsin digested using the ProteinWorks™ eXpress kit according to the manufacturer's instructions (Waters, Saint-Quentin, France). Labeled proteotypic peptides were used as internal standards (ISs) and a mix solution of standards was added to the digestion buffer to get a final concentration of 250 nM. After digestion, samples were cleaned using 30 mg Oasis HLB 1cc Cartridges (Waters). Cartridges were conditioned, equilibrated, loaded, washed and eluted with methanol (1 mL), water (1 mL), samples (~200  $\mu$ L), 5% methanol (1 mL) and 80% methanol (500  $\mu$ L), respectively. Samples were finally dried in a stream of nitrogen, reconstituted with 100  $\mu$ L of 5% acetonitrile and 10  $\mu$ L were injected into the LC-MS/MS system. LC-MS/MS analyses were performed on a Xevo® TQD mass spectrometer with an electrospray interface and an Acquity H-Class® UPLC™ device (Waters). Data acquisition and analyses were performed with MassLynx® and TargetLynx® software, both version 4.1, (Waters). Proteotypic peptides were

separated over 8 min on an Acquity® BEH C<sub>18</sub> column 2.1 × 100 mm, 1.7 μm, (Waters) held at 60°C with a linear gradient of mobile phase B (100% acetonitrile) in mobile phase A (5% acetonitrile in water), each containing 0.1% formic acid, at a flow rate of 600 μL/min. Mobile phase B was linearly increased from 1% to 50% for 5 min, kept constant for 1 min, returned to the initial condition over 1 min, and kept constant for 1 min before the next injection. Proteotypic peptides were then detected by the mass spectrometer with the electrospray interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 3 kV; desolvation gas (N<sub>2</sub>) flow and temperature, 900 L/h and 400 °C; source temperature, 150 °C). The multiple reaction mode was applied as detailed in *supplemental Table 1*. Chromatographic peak area ratios between peptides and their respective ISs constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves and a linear regression model (1/x weighting) was used for quantification. ApoE serum concentrations were expressed in nM assuming 1 mole of peptide equivalent to 1 mole of protein. Concentrations were then converted to mg/dL assuming a molecular weight of 34 kDa for apoE.

**Apolipoprotein kinetics** - <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine enrichment measurements were assessed in both apo(a) and apoE simultaneously to their quantification and data analysis was achieved as previously described<sup>1,2</sup>. Apolipoprotein enrichment measurements were performed on 3 replicates of all kinetic time points and coefficients of variation did not exceed 7.3%. Kinetic analysis was achieved using the Simulation, Analysis, and Modeling II software (SAAM II, Epsilon Group, Charlottesville, VA, USA). Apo(a) pool sizes were considered constant as no significant variation was observed in apo(a) concentrations during the time course of the kinetic study (*Supplemental Figure 1*). At steady-state, the fractional catabolic rate (FCR) of apo(a) is equal to the fractional synthetic rate (FSR) calculated as follows: FSR = change in product labelling/precursor labelling<sup>3</sup>. As recommended<sup>3</sup>, we did not use serum leucine as precursor but serum apoE as a surrogate, as apoE enrichment in <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine reached an asymptotic plateau ( $\square M3/M0 = 5.34 \pm 0.05 \%$ ) within 1 hour, thus reflecting the intracellular amino-acid labelling precursor pool (i.e. precursor labelling). Assuming a much slower turnover rate, the change in apo(a) labelling was determined using a linear fit of the enrichment curves between 0 and 3 h. Apo(a) production rates (PR) were calculated as the product of the FSR and of the average concentration of serum apo(a) assuming that the serum volume of NHP represents 4.5% of their body weight.

## References

1. Croyal M, Ouguerram K, Passard M, Ferchaud-Roucher V, Chetiveaux M, Billon-Crossouard S, de Gouville AC, Lambert G, Krempf M and Nobecourt E. Effects of Extended-Release Nicotinic Acid on Apolipoprotein (a) Kinetics in Hypertriglyceridemic Patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35:2042-7.

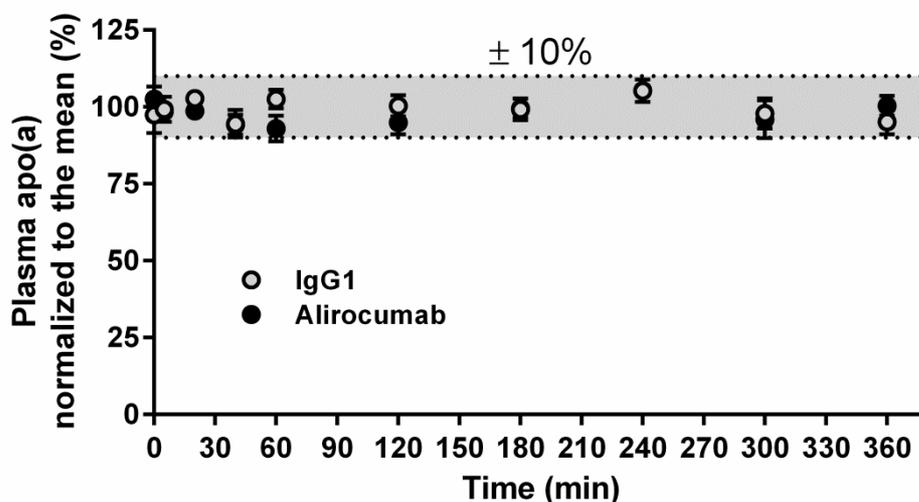
2. Croyal M, Fall F, Ferchaud-Roucher V, Chetiveaux M, Zair Y, Ouguerram K, Krempf M and Nobecourt E. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *Journal of lipid research*. 2016;57:509-15.
3. Xie W, Liu J, Wang W, Wang M, Qi Y, Zhao F, Sun J, Liu J, Li Y and Zhao D. Association between plasma PCSK9 levels and 10-year progression of carotid atherosclerosis beyond LDL-C: A cohort study. *Int J Cardiol*. 2016;215:293-8.

**Supplemental Table 1 - Analytical parameters for the detection of apolipoproteins in NHP serum.**

M0, unlabeled peptide; M3, labeled peptide; IS, internal standard; MRM, multiple reaction monitoring; RT, retention time. Underlined L indicates the putative incorporation site(s) of  $^2\text{H}_3$ -leucine. Bold indicates the labeled amino acid [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ ]-K or [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ ]-R.

Apo		Peptide sequence	Fragment	Cone/collision	MRM transition (m/z)	RT (min)
Apo(a)	M0	LFLEPIGADIALLK	$y_{10}^+$	40/27 V	757.7 → 1011.8	3.7 ± 0.1
	M3	<u>LFLEPIGADIALLK</u>			759.2 → 1011.8+1014.8	
	IS	LFLEPIGADIALLK			761.7 → 1019.8	
ApoE	M0	LGPLVEQGR	$y_5^+$	25/30 V	484.8 → 588.3	2.1 ± 0.1
	M3	<u>LGPLVEQGR</u>			486.3 → 588.3	
	IS	LGPLVEQGR			489.3 → 598.3	

**Supplemental Figure 1 – Variation of serum apo(a) concentrations after bolus injection of tracer throughout the kinetic study.** Values were normalized to the mean and represented as mean ± SEM (n=6) for each time point.



## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Notre peptide signature de l'apo(a) humaine étant très légèrement différent de celui du singe, nous avons adapté notre méthode LC-MS/MS pour la réalisation de ce projet, à laquelle nous avons ajouté un peptide marqueur de l'apoE commun à l'Homme et au singe (séquences très proches).

La  $^2\text{H}_3$ -leucine a été utilisée comme traceur endogène et injectée sous forme de bolus intraveineux. Par conséquent, nous avons tout d'abord opté pour une modélisation à plusieurs compartiments (Barrett *et al.* 2006). Ces modèles mathématiques impliquent la leucine plasmatique comme pool précurseur et nécessitent quatre compartiments afin d'expliquer le métabolisme propre du traceur avant son incorporation au sein des protéines (Barrett *et al.* 2006). Au terme de l'analyse, un recouvrement très acceptable de nos courbes a été obtenu. Cependant, bien qu'amenant aux mêmes conclusions, nos valeurs de taux de production (APR, nmol/kg/jour) et de catabolisme (FCR, pool/jour) étaient très élevées et peu consistantes avec les valeurs usuelles obtenues en modélisation cinétique.

L'emploi des modèles à plusieurs compartiments étant préconisé lorsqu'une collecte importante de données est possible (Barrett *et al.* 2006), nous avons essayé d'acquérir plus d'informations en analysant les enrichissements dans les fractions lipoprotéiques. Du fait des faibles volumes de plasma disponibles, seule la FPLC a pu être utilisée pour l'isolement de ces fractions. Malheureusement, les dilutions engendrées par cette méthode ne nous ont pas permis d'acquérir des données fiables. Nous avons donc choisi d'utiliser un modèle algébrique à l'instar d'une étude méthodologique similaire publiée en parallèle de nos travaux (Xie *et al.* 2016). Nous avons ainsi considéré que l'apo(a) a un renouvellement lent, et avons choisi l'apoE comme pool précurseur, cette dernière atteignant rapidement un plateau asymptotique d'enrichissement. Nos résultats ont été conformes à ceux précédemment publiés (Xie *et al.* 2016).

Nous avons ainsi montré que l'Alirocumab, inhibiteur de PCSK9, réduit les niveaux circulants du LDL-C, de l'apo(a) et de l'apoE chez le singe. En outre, une forte diminution de la production d'apo(a) a été constatée contrairement aux taux cataboliques fractionnés (FCR). Ces travaux ont renforcé nos hypothèses initiales et ont permis de montrer que l'inhibition de PCSK9 par l'Alirocumab réduit les taux de Lp(a) principalement par la réduction de la production et/ou de la sécrétion d'apo(a).

A noter que le singe est l'une des rares espèces à produire de l'apo(a). Cependant, ce modèle présente quelques limites. La première est que les singes (*Macaca fascicularis*) utilisés présentent une apo(a) dont la taille est en général plus petite que la forme humaine (moins de copies du Kringle IV<sub>2</sub>) (Enkhmaa *et al.* 2015). La seconde est que nous avons traité ces animaux avec de l'Alirocumab en monothérapie. Il reste donc à établir si le taux de production de l'apo (a) est également réduit par l'Alirocumab en association avec d'autres médicaments hypolipémiants traditionnels tels que les statines. En outre, l'Alirocumab a réduit les niveaux de Lp(a) de 58% chez nos singes alors qu'une réduction moins marquée de 19% a été observé chez l'Homme dans une étude similaire (18 volontaires) (Reyes-Soffer *et al.* 2017). Dans cette étude humaine, bien que l'Alirocumab réduise les taux de Lp(a) (-19 %), aucune altération significative du taux de production d'apo(a) (-9 %, p = 0.6) n'a été observée alors qu'une tendance non significative à l'augmentation du taux de catabolisme de l'apo (a) a été constatée (+25 %, p = 0.09) (Reyes-Soffer *et al.* 2017). Ces résultats contradictoires soulignent le fait que de nouvelles études humaines sont nécessaires afin de clairement statuer sur ce point.

### Article 3

## **Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS**

Croyal M, Fall F, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Zaïr Y, Ouguerram K, Krempf M, Nobécourt E

*J Lipid Res*, 2016, 57: 509-515

Notre méthodologie LC-MS/MS ayant montré son efficacité pour l'analyse cinétique, statique et polymorphique de l'apo(a), nous avons choisi d'étendre la méthode aux apolipoprotéines majeures impliquées dans le métabolisme des lipides : les apoA-I, apoA-II, apoB100, apoC-II, apoC-III et apoE. Dans cet article méthodologique, nous avons comparé la LC-MS/MS à l'ELISA pour l'aspect quantitatif, puis à l'électrophorèse/GC-MS pour la mesure cinétique des enrichissements avec la  $^2\text{H}_3$ -leucine comme traceur endogène. Pour ces comparaisons méthode-méthode, nous avons choisi les deux principales apolipoprotéines de structure étudiées par notre laboratoire : l'apoA-I (HDL) et l'apoB100 (VLDL, IDL et LDL).

Nos résultats ont montré que l'approche LC-MS/MS permet l'obtention de données fiables et en un temps beaucoup plus court. En plus de permettre la mesure simultanée des enrichissements et des concentrations, notre nouvelle approche s'est montrée fiable et répétable pour le suivi simultané des six apolipoprotéines ciblées. Enfin, les paramètres cinétiques de base ont été calculés à partir des données générées par LC-MS/MS, puis comparés à ceux de la littérature employant les méthodes conventionnelles. Les débits de production et de catabolisme se sont avérés conformes à ceux déjà connus pour les HDL-apoA-I, HDL-apoA-II, VLDL-apoB100, IDL-apoB100, LDL-apoB100, HDL-apoC-III, VLDL-apoC-III, HDL-apoE et VLDL-apoE. Aucune donnée cinétique n'a été trouvée pour l'apoC-II dans des protocoles utilisant un traceur isotopiquement stable (uniquement radioactif).



Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2016/01/15/jlr.D064618.DC1.html>

methods

## Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS<sup>§</sup>

Mikaël Croyal,<sup>\*,†</sup> Fanta Fall,<sup>\*,†</sup> Véronique Ferchaud-Roucher,<sup>\*,†</sup> Maud Chétiveaux,<sup>†</sup> Yassine Zaïr,<sup>†</sup> Khadija Ouguerram,<sup>\*,†</sup> Michel Krempf,<sup>1,\*,†,§</sup> and Estelle Nobécourt<sup>\*,†,§</sup>

INRA,\* UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, CHU Hôtel-Dieu, F-44000 Nantes, France; CRNHO,<sup>†</sup> West Human Nutrition Research Center, CHU, F-44093 Nantes, France; and Department of Endocrinology,<sup>§</sup> Metabolic Diseases, and Nutrition, G and R Laennec Hospital, F-44093 Nantes, France

**Abstract** A multiplexed assay was developed by MS to analyze, in a single run, six major human Apos involved in lipoprotein metabolism: ApoA-I, ApoA-II, ApoB100, ApoC-II, ApoC-III, and ApoE. This method was validated in vivo in six subjects who received a 14 h constant infusion of [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]L-leucine at 10 μM/kg/h. Plasma lipoprotein fractions were isolated from collected blood samples and were digested with trypsin. Proteotypic peptides were subsequently analyzed by LC/MS/MS. Enrichment measurement data were compared with those obtained by the standard method using GC/MS. The required time to obtain the LC/MS/MS data was less than that needed for GC/MS. The enrichments from both methods were correlated for ApoA-I ( $r = 0.994$ ;  $P < 0.0001$ ) and ApoB100 ( $r = 0.999$ ;  $P < 0.0001$ ), and the Bland-Altman plot confirmed the similarity of the two methods. Intra- and inter-assay variability calculated for the six Apos of interest did not exceed 10.7 and 12.5%, respectively, and kinetic parameters were similar and/or in agreement with previously reported data.<sup>¶</sup> Therefore, LC/MS/MS can be considered as a useful tool for human Apo kinetic studies using stable isotopes.—Croyal, M., F. Fall, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, Y. Zaïr, K. Ouguerram, M. Krempf, and E. Nobécourt. **Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS.** *J. Lipid Res.* 2016. 57: 509–515.

**Supplementary key words** lipoproteins/metabolism • lipoproteins/kinetics • nutrition protein • multiplexed assay • stable isotope • liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Lipoprotein kinetic studies using radioactive or stable isotope tracers have been performed for years in humans to gain a better understanding of the mechanisms involved in lipid metabolism disturbances and related diseases (1, 2). Endogenous labeling with an amino acid tracer of Apo, a main component of lipoproteins, is commonly used, assuming the kinetics of Apos represent a good estimate of

those of the entire lipoprotein metabolism (1, 3). The incorporation of a labeled amino acid into the protein during its synthesis is subsequently measured over time and analyzed with a compartmental model to obtain the kinetic data (4, 5). The reference method to measure tracer enrichments involves isolation of the Apos by gel electrophoresis followed by acid hydrolysis to obtain unlabeled and labeled amino acids. Then, the amino acids are derivatized for GC/MS analysis (3). These approaches are limited to one or a small number of relatively abundant Apos and remain a time-consuming process. Kinetic studies are therefore mainly focused on the most abundant structural Apos (ApoA-I and ApoB100) and less on others, although they have a central role in lipid metabolism (ApoC-II, ApoC-III and ApoE) (6).

The combination of proteomic tools, such as enzymatic proteolysis and liquid LC/MS/MS, has appeared recently to be a powerful tool to study plasma proteins (7–11). Although promising, one analytical challenge is to use this method in a single run analysis for the determination of concentrations and tracer enrichments of a significant set of plasma proteins with large differences in molecular mass or abundances (6, 11).

We recently published an LC/MS/MS method to simultaneously measure the concentration, tracer enrichment, and average size of Apo(a) (9, 12). In the present study, we aimed to describe the development and the validation of a multiplexed LC/MS/MS method, performing in a single run the enrichment measurements and the quantification of six major human Apos (ApoA-I, ApoA-II, ApoB100, ApoC-II, ApoC-III, and ApoE) in plasma samples obtained from a stable isotope kinetic study in humans.

Abbreviations: AB, ammonium bicarbonate; CV, coefficient of variation; FCR, fractional catabolic rate; HCl, hydrochloric acid; LC/HRMS, LC-high resolution MS; M0, unlabeled peptide; M3, <sup>3</sup>H<sub>3</sub>-leucine-labeled peptide; MRM, multiple reaction monitoring; NaOH, ammonium hydroxide; PR, production rate; SDC, sodium deoxycholate.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.

e-mail: michel.krempf@univ-nantes.fr

<sup>§</sup>The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains a supplement.

This work was supported by the Biogenouest CORSAIRE core facility.

Manuscript received 18 October 2015 and in revised form 8 January 2016.

Published, JLR Papers in Press, January 15, 2016  
 DOI 10.1194/jlr.D064618

Copyright © 2016 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

Journal of Lipid Research Volume 57, 2016 509

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2016/01/15/jlr.D064618.DC1.html>

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

UPLC/MS-grade acetonitrile, water, and 99% formic acid were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Ammonium bicarbonate (AB), [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]L-leucine, DTT, iodoacetamide, sodium deoxycholate (SDC), trypsin, ammonium hydroxide (NaOH), and 37% hydrochloric acid (HCl) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Synthetic labeled and unlabeled peptides were purchased from Thermo Scientific Biopolymers (Einsteinstrasse, Germany).

### Subjects and sample collection

Six overweight male subjects (age: 46 ± 16 years; body mass index: 31.8 ± 1.5 kg/m<sup>2</sup>) with hypertriglyceridemia (plasma triglycerides: 208 ± 57 mg/dl) were enrolled. After an overnight fast, each subject received a bolus of 10 μM/kg <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine, which allowed a faster plasma enrichment plateau, immediately followed by a constant infusion (10 μM/kg/h) of <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine for 14 h. Blood samples were collected at 0, 0.75, 1.5, 2.5, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 h in EDTA tubes (Venoject, Paris, France), and the plasma was separated by centrifugation at 4°C for 30 min. Plasma lipoprotein fractions, including VLDL, LDL, IDL, and HDL, were separated by sequential ultracentrifugation methods (13, 14) and stored at -80°C until analysis. The Ethics Committee of Nantes University Hospital approved the clinical protocol, and written informed consent was obtained from each subject (reference trial number: NCT01216956).

### Selection of peptide markers

Apo sequences were BLAST searched using the UNIPROT tool ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), and theoretical proteotypic peptides were searched using the free software peptide mass calculator ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass](http://web.expasy.org/peptide_mass)). The peptide candidates were selected to maximize sensitivity, specificity, and stability. Therefore, peptides carrying methionine and cysteine residues were not considered due to potential oxidation and peptides having less than seven amino acids were excluded. Furthermore, peptide candidates had to contain at least one leucine residue for <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine enrichment measurement. Each putative candidate was then experimentally sought in the appropriate concentrated lipoprotein fraction and then characterized by LC-high resolution MS (LC/HRMS).

### Sample preparation for LC/MS/MS analysis

The plasma lipoprotein fractions (100 μl) were desalted and concentrated with 50 mM AB buffer (pH 8; 3 ml) and a 5,000 Da molecular mass cut-off filter. The concentrated samples (100 μl) were mixed with 50 mM AB buffer (pH 8; 88 μl), 10% SDC (10 μl), and 500 mM DTT (2 μl). The samples were reduced for 30 min at 60°C, then alkylated with 2 μl of fresh iodoacetamide solution (1 M in 1 M NaOH) for 60 min at room temperature, and protected from light. The samples were digested overnight with 10 μl of trypsin solution (0.1 mg/ml in 1 mM HCl), and 10 μl of 20% formic acid was added to stop the reaction and to precipitate the SDC. Finally, the samples were centrifuged at 15,000 g at 4°C for 15 min, and the supernatants (150 μl) were transferred to vials for LC/MS/MS analyses. Apos were quantified in plasma and plasma lipoprotein fractions, as previously described (12), using synthetic proteotypic peptides for standard solutions and labeled [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>]K or [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>]R synthetic peptides as internal standards (Table 1). Apo quantification was achieved in three replicates and at three kinetic time points (baseline, 6 h, and 14 h).

### LC/MS/MS parameters

Peptide candidates were identified and characterized using a LC/HRMS system composed of a Synapt G2 HDMS<sup>®</sup> quadrupole-TOF mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA) with an ESI interface and an Acquity H-Class<sup>®</sup> UPLC<sup>™</sup> device (Waters Corporation). High throughput analyses were then performed on a Xevo<sup>®</sup> triple-quadrupole mass spectrometer with an ESI interface equipped with an Acquity H-Class<sup>®</sup> UPLC<sup>™</sup> device. Data acquisition and analyses were performed with MassLynx<sup>®</sup> and TargetLynx<sup>®</sup> software, respectively (version 4.1; Waters Corporation). Labeled and unlabeled peptides were separated on an Acquity<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm, Waters) at 60°C with a linear gradient of mobile phase B (acetonitrile containing 0.1% formic acid) in mobile phase A (5% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid) at a flow rate of 600 μl/min. Mobile phase B was linearly increased from 1 to 50% for 5 min, kept constant for 1 min, returned to the initial condition over 1 min, and kept constant for 1 min before the next injection. Ten microliters of each sample was injected into the LC column. Labeled and unlabeled peptides were then detected by the mass spectrometer with the ESI interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 4 kV; desolvation gas (N<sub>2</sub>) flow and temperature, 1,000 l/h and 400°C; source temperature, 120°C). The multiple reaction monitoring (MRM) mode was applied for MS/MS detection, and the parameters were optimized for each peptide from synthetic peptide solutions. Selected MRM transitions, cone voltages, and collision energies are described in Table 1.

### Conventional GC/MS method for ApoA-I and ApoB100 kinetic measurements

Isolation and measurement of leucine enrichment in ApoB100 and ApoA-I were described previously (14, 15). Briefly, ApoB100- and ApoA-I-containing lipoprotein fractions were isolated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and then hydrolyzed with HCl. Amino acids were purified by cation exchange chromatography, derivatized (*N*-propanol-acetyl chloride and heptafluorobutyric acid), and analyzed by GC/MS to determine [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]leucine enrichment. ApoA-I concentrations were measured by immunonephelometry (Behring, Rueil Malmaison, France), and ApoB100 concentrations were obtained by selective precipitation and GC/MS with norleucine as internal standard (16).

### Data management

The M3/M0 ratios were calculated using the chromatographic peak areas, where M3 corresponds to the <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine-labeled peptide, and M0 corresponds to the unlabeled peptide. For peptides containing two leucines (ApoA-I and ApoE), two M3 isotopomers could form and be detected simultaneously by the selected MRM transitions. Their proportions were assumed to be identical, as described previously (9, 17), and the analytical signal obtained during labeled ApoA-I and ApoE detection was experimentally enhanced 2-fold by the two coeluted isotopomers. In addition, the peptide isotopologues of ApoA-I and ApoE, containing two labeled leucine residues, were not detected in our analytical conditions and were considered as negligible. Therefore, the M3/M0 ratios measured in the biological samples were corrected by dividing the primary result by two, as described previously (17). The M3/M0 ratios measured at baseline were subtracted from the following time point ratios. Chromatographic peaks having signal-to-noise ratios below the limit of quantification of 10:1 were excluded and samples were reanalyzed using higher sample volumes before the concentration step (400 μl). Apo concentrations were calculated using calibration curves plotted from standard solutions, as described previously (12). The

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2016/01/15/jlr.D064618.DC1.html>

primary results were expressed in nanomoles and were converted to milligrams per deciliter assuming 1 mol of peptide equal to 1 mol of protein (10).

### Kinetic analysis

Kinetic analysis was achieved using the SAAM II modeling program (Epsilon Group, Charlottesville, VA). HDL-ApoA-I, HDL-ApoE, and VLDL-ApoE fractional catabolic rates (FCRs) were estimated from the 14 h samples with a mono-compartmental model, as described previously (18, 19). We applied the same model for HDL-ApoA-II, HDL-ApoC-III, and VLDL-ApoC-III according to Batal et al. (20) and Chan et al. (21), but also for HDL-ApoC-II and VLDL-ApoC-II. Kinetic data of VLDL-, IDL-, and LDL-ApoB100 were calculated using a three compartmental model, as previously described (22). Plasma leucine was used as precursor pool and pool sizes were considered to be constant, as no significant variation was observed on Apo concentrations at different sampling times (not shown). According to this steady state model, the FCR was equal to the fractional synthetic rate. Production rates (PRs) were calculated by the product of the FCR and the pool sizes of Apos in plasma lipoprotein fractions, assuming a plasma volume of 4.5% of body weight. For ApoE, ApoC-II, and ApoC-III, the concentrations that were not recovered (in the bottom fractions) were considered to be predominantly HDL Apos and these amounts were mathematically added to HDL for calculation of HDL pool sizes (20).

### Validation of the multiplexed LC/MS/MS method and statistical analysis

To assess the intra- and inter-assay variability of the LC/MS/MS method, pooled plasma lipoprotein fractions were prepared by mixing 400  $\mu$ l of plasma lipoprotein fractions from the six subjects at the following kinetic time points: baseline, 45 min, 6 h, and 14 h. These points were chosen to reach baseline, low, intermediate, and high tracer enrichment levels, respectively. The VLDL fractions were used for ApoB100 assay validation, and the HDL fractions were used for the other Apos (i.e., ApoA-I, ApoA-II,

ApoC-II, ApoC-III, and ApoE). Each pool was then divided into 18 equal fractions of 100  $\mu$ l and treated as described above. Six fractions per time point were analyzed, and the analyses were repeated on three consecutive days. The intra- and inter-assay variability of the LC/MS/MS method was calculated [coefficient of variation (CV), percent] with a maximum tolerance level of 15% (23). To assess the accuracy of the LC/MS/MS method, enrichment of ApoA-I in the HDL sample and ApoB100 in the VLDL, IDL, and LDL samples were measured by conventional methods using GC/MS (six subjects, 10 kinetic time points per plasma lipoprotein fraction). The paired results, baseline excluded, obtained for ApoA-I (HDL, n = 54) and ApoB100 (VLDL, IDL, and LDL, n = 162) with both analytical methods were analyzed using a Pearson correlation test. A Bland-Altman plot was also generated to test the similarity of both methods accurately (24). Graphics and statistical analyses were achieved with GraphPad Prism software (version 6.0; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

## RESULTS

### Selection of peptide markers

The selection of specific peptide markers was performed successfully for each target Apo by LC/HRMS. The in silico selection of the proteotypic peptides led to 2 (ApoA-II and ApoC-III), 3 (ApoC-II), 16 (ApoE), 19 (ApoA-I), and 73 (ApoB100) peptide candidates. The most specific and detectable of them were selected to optimize the assay sensitivity and specificity. As shown in **Table 1**, each candidate was detected as a doubly charged precursor ion, except for ApoC-II. After MS/MS fragmentations, each precursor ion yielded between 10 (ApoE) and 29 (ApoC-III) specific and singly charged product ions (supplementary Fig. 1A, B). As an example, for ApoA-I and ApoB100,

TABLE 1. Summary of the analytical parameters selected for the detection of Apos

Apo	Peptide Sequence	Fragment	Cone/Collision (V)	MRM Transition ( <i>m/z</i> )	Retention Time (min)	
ApoA-I	M0	ATEHLSTLSEK	$y_6^+$	30/25 V	608.3 $\rightarrow$ 664.3	
	M3	ATEHLSTLSEK				609.8 $\rightarrow$ 664.3 + 667.3
	IS	ATEHLSTLSEK				612.3 $\rightarrow$ 672.3
ApoA-II	M0	SPELQAEAK	$y_6^+$	30/30 V	486.8 $\rightarrow$ 659.3	
	M3	SPELQAEAK				488.3 $\rightarrow$ 662.3
	IS	SPELQAEAK				490.3 $\rightarrow$ 667.3
ApoB100	M0	NLQNNAEWVYQGAIR	$y_6^+$	50/30 V	888.5 $\rightarrow$ 707.4	
	M3	NLQNNAEWVYQGAIR				890.0 $\rightarrow$ 707.4
	IS	NLQNNAEWVYQGAIR				893.5 $\rightarrow$ 717.4
ApoC-II	M0	TAAQNLYEK	$y_4^+$	80/30 V	1,037.9 $\rightarrow$ 552.3	
	M3	TAAQNLYEK				1,040.9 $\rightarrow$ 555.3
	IS	TAAQNLYEK				1,045.9 $\rightarrow$ 560.3
ApoC-III	M0	DALSSVQESQVAQQAR	$y_8^+$	40/35 V	858.9 $\rightarrow$ 887.5	
	M3	DALSSVQESQVAQQAR				860.4 $\rightarrow$ 887.5
	IS	DALSSVQESQVAQQAR				863.4 $\rightarrow$ 897.5
ApoE	M0	LGPLVEQGR	$y_5^+$	25/30 V	484.8 $\rightarrow$ 588.3	
	M3	LGPLVEQGR				486.3 $\rightarrow$ 588.3
	IS	LGPLVEQGR				489.3 $\rightarrow$ 598.3

Underlined L indicates the putative incorporation site(s) of  $^2H_3$ -leucine. Bold indicates the labeled amino acid [ $^{13}C_6$ ,  $^{15}N_2$ ]K or [ $^{13}C_6$ ,  $^{15}N_4$ ]R. IS, internal standard.

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2016/01/15/jlr.D064618.DC1.html>

the complete characterization of the fragmentation patterns identified the peptide sequences underlying their specificity. The most intense product ion was then selected for MRM transitions leading to the specific detection of the target peptides (supplementary Fig. 1C). As illustrated for ApoE (supplementary Fig. 2), the MRM mode allowed the specific detection of both labeled and unlabeled target peptides. As expected, the chromatographic peak intensities corresponding to the labeled ApoE peptide (M3) increased during the course of the labeled tracer perfusion.

#### Comparison of LC/MS/MS with conventional GC/MS methods

As illustrated in Fig. 1A, the data obtained with the two methods were not statistically different and were significantly correlated with a slope close to one for ApoA-I in HDL ( $r = 0.994$ ,  $P < 0.0001$ ,  $y = 0.99x + 0.01$ ) and ApoB100 in VLDL/IDL/LDL ( $r = 0.999$ ,  $P < 0.0001$ ,  $y = 1.001x + 0.013$ ). For the Bland-Altman plot, the mean difference and the limits of agreement, corresponding to the 95% confidence level (i.e., mean  $\pm 1.96 \times$  SD), were drawn (Fig. 1B), and 94 and 98% of the points were between the limits of similarity for ApoA-I and ApoB100, respectively.

#### Validation of the LC/MS/MS method

The accuracy of the LC/MS/MS method was established by comparing the ApoA-I and ApoB100 enrichment measurements with those obtained by the reference meth-

ods used for many years, as described above. The precision of the LC/MS/MS measurements was determined by CVs calculated from six replicates per enrichment level and over three distinct experiments. The intra- and inter-assay variability did not exceed 10.7 and 12.5%, respectively, for any of the Apos or for various enrichments ranging from 0.04 to 7.72% (supplementary Table 1). Finally, the LC/MS/MS efficiency is illustrated in Fig. 2, which shows the kinetic enrichment curves of the six Apos. The kinetic measurements were assessed simultaneously in 240 samples within 1 week (6 subjects, 10 kinetic time points, and 4 plasma lipoprotein fractions).

#### Kinetic parameters of Apos

Apos were successfully quantified in plasma and lipoprotein fractions by LC/MS/MS. Total recoveries (mean  $\pm$  SEM) of ApoE, ApoC-II, and ApoC-III in plasma lipoprotein fractions separated by ultracentrifugation were  $69.7 \pm 2.5\%$ ,  $79.1 \pm 6.9\%$ , and  $67.5 \pm 2.7\%$ , respectively, and ranged from 96.2 to 104.7% for ApoA-I, ApoA-II, and ApoB100. As CVs did not exceed 12.4% and Apo concentrations were stable throughout the kinetics, the mean values were kept as final concentrations (Table 2). ApoA-I/ApoA-II concentration ratio was of  $4.0 \pm 0.7$  in HDL and ApoC-III/ApoC-II concentration ratios were of  $3.3 \pm 0.3$  and  $3.3 \pm 0.9$  in HDL and VLDL, respectively. As shown in Table 2, ApoA-I and ApoB100 concentrations measured by LC/MS/MS and conventional methods were not different.

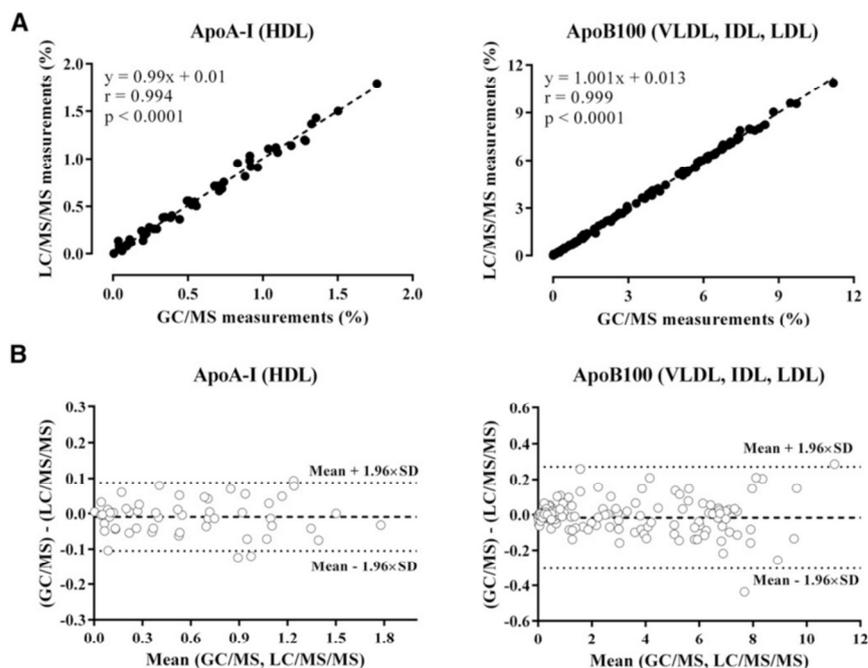


Fig. 1. Comparison of the conventional GC/MS method and the LC/MS/MS method for  $^2\text{H}_3$ -leucine incorporation measurements in ApoA-I (HDL,  $n = 54$ ) and ApoB100 (VLDL, IDL, and LDL,  $n = 162$ ). Linear correlation obtained between the two methods (A) and comparison of the two methods using the Bland-Altman plot (B). For the Bland-Altman plot, the average enrichment levels (percent) obtained by both methods were calculated and then plotted against the difference of the two measurements.

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2016/01/15/jlr.D064618.DC1.html>

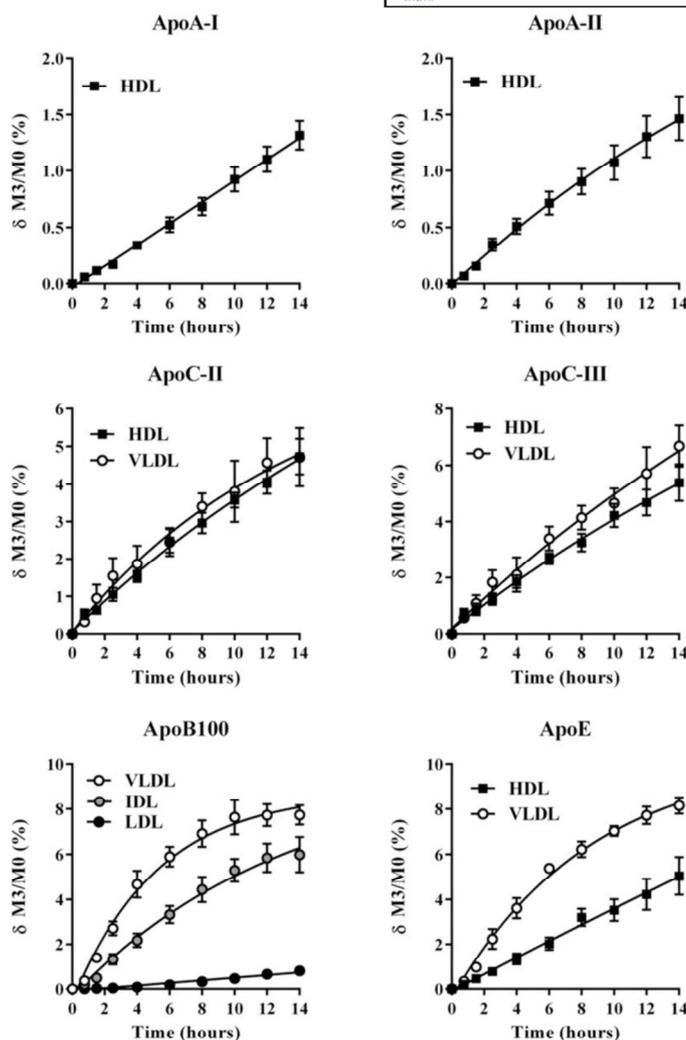


Fig. 2. Mean changes in  $^2\text{H}_3$ -leucine incorporation over the course of the tracer infusion in six hypertriglyceridemic patients. Basal enrichment was subtracted ( $\delta \text{M3/M0}$ ). Results were obtained for ApoA-I (HDL), ApoA-II (HDL), ApoB100 (VLDL, IDL, and LDL), ApoC-II (VLDL, HDL), ApoC-III (VLDL, HDL), and ApoE (VLDL, HDL). Values are presented as the mean  $\pm$  SEM.

Kinetic parameters of Apos were also similar with both methods for ApoB100 and ApoA-I. Compared with previous reported data, the results obtained for ApoA-II, ApoC-II, ApoC-III, and ApoE were in similar ranges (Table 2, supplementary Table 2).

## DISCUSSION

The current approaches with the conventional GC/MS method to measure the Apo kinetics of lipoproteins using stable isotope-labeled tracers are often limited to a small number of relatively abundant proteins, such as ApoB100 and ApoA-I, and require a complex and time-consuming preparation. This study demonstrated that enzymatic proteolysis and subsequent LC/MS/MS analysis can overcome this pitfall.

The choice of the peptide candidates is a critical point to conduct Apo measurements by LC/MS/MS. They must

be selected to not interfere with other nontargeted proteins. For example, the amino acid sequence of ApoB48 is 48%, identical to that of the N-terminal ApoB100 sequence (25). The trypsin digestion of ApoB100 yields a set of peptides indistinguishable from those generated for ApoB48; therefore, they must not be considered (not shown). All the candidates shown in Table 1 meet this criteria and some of them (ApoA-I, ApoA-II, and ApoE) were identical to those selected by Ceglarek et al. (11). The high level of reproducibility (CVs <15%) reinforced their relevance for the kinetic enrichment measurements of the targeted Apos.

We confirmed that LC/MS/MS is able to accurately quantify plasma proteins, as previously published (6, 8, 10, 11). We measured similar ApoB100 and ApoA-I concentrations whatever the analytical method previously employed. For the other Apos, the concentrations were in the same range compared with other studies involving either LC/MS/MS (6, 8, 11) or conventional methods (5, 14, 15,

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2016/01/15/jlr.D064618.DC1.html>

TABLE 2. Kinetic parameters of Apos

Apos	Concentration (mg/dl)	FCR (pool/day)	PR (mg/kg/day)
HDL-ApoA-I, LC/MS/MS	139.0 ± 10.5	0.28 ± 0.04	17.7 ± 3.0
HDL-ApoA-I, GC/MS	136.3 ± 7.6	0.28 ± 0.04	17.2 ± 2.6
HDL-ApoA-II, LC/MS/MS	38.8 ± 6.4	0.36 ± 0.06	6.0 ± 1.0
VLDL-ApoB100, LC/MS/MS	8.8 ± 1.1	5.44 ± 1.1	20.7 ± 2.8
VLDL-ApoB100, GC/MS	8.7 ± 1.2	5.65 ± 0.9	21.3 ± 2.8
IDL-ApoB100, LC/MS/MS	3.9 ± 0.5	5.66 ± 1.15	10.0 ± 2.5
IDL-ApoB100, GC/MS	3.7 ± 0.4	5.60 ± 1.12	9.9 ± 2.6
LDL-ApoB100, LC/MS	52.5 ± 8.3	0.30 ± 0.04	7.0 ± 1.3
LDL-ApoB100, GC/MS	49.5 ± 6.5	0.31 ± 0.05	6.8 ± 1.3
HDL-ApoC-II, LC/MS/MS	1.5 ± 0.3	1.39 ± 0.30	0.9 ± 0.2
VLDL-ApoC-II, LC/MS/MS	5.4 ± 1.5	1.44 ± 0.45	3.3 ± 1.1
HDL-ApoC-III, LC/MS/MS	4.5 ± 0.9	1.11 ± 0.12	3.2 ± 0.8
VLDL-ApoC-III, LC/MS/MS	13.2 ± 1.7	1.17 ± 0.18	13.0 ± 2.0
HDL-ApoE, LC/MS/MS	2.5 ± 0.5	0.58 ± 0.09	0.7 ± 0.3
VLDL-ApoE, LC/MS/MS	1.6 ± 0.3	2.70 ± 0.46	2.0 ± 0.6

Values are mean ± SEM.

18–22, 26–28). In addition, ApoA-I/ApoA-II and ApoC-III/ApoC-II concentration ratios were also in the reported ranges (6, 11, 19, 21, 26). However, some drawbacks may be encountered when using LC/MS/MS. The use of proteotypic peptides involves an optimal proteolysis to obtain a full recovery; otherwise the concentrations could be underestimated. Using our protocol and an overnight trypsin digestion, the hydrolysis was complete for each target protein (6, 9–11). LC/MS/MS detector responses could also be altered by matrix effects. It was unfortunately impossible to accurately quantify Apos directly in desalted samples of lipoproteins (5,000 Da molecular mass cut-off filter) because we did not find solution to assess total Apo recoveries during the desalting process. For quantification, samples were therefore assayed separately and the sample dilution (1/25) minimized matrix effects (12) without significantly affecting the limit of quantification of the Apos analyzed in this study (signal-to-noise ratio >10 in each sample). LC/MS/MS is based on proteotypic peptide analysis and results are primarily expressed as moles per liter. To convert concentrations in milligrams per deciliter, protein molecular masses are used, assuming a single polymorphic isoform for each Apo. This is not the case for ApoE and ApoC-III (20). The accurate detection of isoforms could be assessed by LC/MS/MS (10, 12), but this is a complex analysis. We have assumed that these polymorphic variations did not significantly alter the molecular masses of the targeted Apos. This is another limitation of LC/MS/MS, but the comparison with the other methods used for concentration measurements is reassuring and suggests that this pitfall is probably not critical. The protocol used (primed and constant infusion of the tracer) is another limitation, as tracer boluses are often preferred for proteins with slow turnover rates (29). With this latter study design, the peak enrichments are different compared with the range we have analyzed. Additional studies are warranted to validate this LC/MS/MS method with the bolus tracer study design.

To compare and validate our LC/MS/MS method with the conventional GC/MS method for enrichment measurements, we used 240 biological samples (6 subjects, 10 kinetic time points, 4 plasma lipoprotein fractions). From

isolation by gel electrophoresis (VLDL-, IDL-, LDL-ApoB100, and HDL-ApoA-I) to GC/MS processing, it took 3 weeks to obtain results, while the LC/MS/MS results were obtained within 5 days. We acknowledge that this observation relied on the laboratory technical resources, but the LC/MS/MS method was also able to provide measurements for additional Apos (Fig. 2), which would have required some additional time with the conventional method. As suggested above, one limitation of the LC/MS/MS method measurements was the loss of accuracy for chromatographic peaks having signal-to-noise ratios below 10. For the six Apos studied, only seven samples (five VLDL and two IDL samples, ApoB100 only) needed to be reanalyzed. The problem was overcome by using higher sample volumes (400 µl) during the concentration step. As shown by the Bland-Altman analysis, the enrichments measured by LC/MS/MS in this study were identical to those measured with the conventional GC/MS method and were in the same range as those reported previously by others using similar stable isotope protocols and the GC/MS method for ApoA-I (15, 26) and ApoB100 (20, 27). Similar results have been also reported for ApoA-II (21, 26), ApoE (19, 20), and ApoC-III (20, 28). To the best of our knowledge, no data have been published for ApoC-II with GC/MS measurements.

The kinetics of Apos were in good agreement with those previously published in several studies (see supplementary Table 2). For HDL-ApoA-I- and HDL-ApoB100-containing lipoproteins, FCRs and PRs were similar whatever the analytical method employed and in the same range as those already published (5, 14, 18–22, 26, 27). In addition, HDL-ApoA-II FCRs were close to those obtained for HDL-ApoA-I and ensuing PRs were also consistent with previous estimates (21, 26). Similar findings were observed for ApoE and ApoC-III (19, 20, 28), although the patients studied and the study design were not perfectly comparable. As previously explained (28) and unlike ApoE (19, 20), ApoC-III FCRs calculated in VLDL and HDL were similar, supporting rapid exchanges of ApoC-III between both particles. We found similar data for ApoC-II but, to our knowledge, no previous work can support this finding. Despite the lack of direct comparisons in our study with

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2016/01/15/jlr.D064618.DC1.html>

the conventional GC/MS method for ApoA-II, ApoC-II, ApoC-III, and ApoE, the comparison of our kinetic data with already published works supported the efficiency of the LC/MS/MS method.

Finally, we could easily add the kinetic analysis for Apo(a) that we have reported previously (12) to this multiplexed LC/MS/MS analysis. Along with others, we have recently shown that LC/MS/MS can also be used to quantify plasma proteins and assess protein sequence modifications, such as polymorphic size (6, 10–12). In this study, we have focused on the concentrations and the tracer enrichments of six major human Apos, measured using a simple and fast protocol. These analytical methods could be merged and adapted continually to obtain, in a single run, the concentrations, polymorphic modifications, and stable isotope enrichments of most of the human Apos, making LC/MS/MS a useful tool for human lipoprotein kinetic studies. 

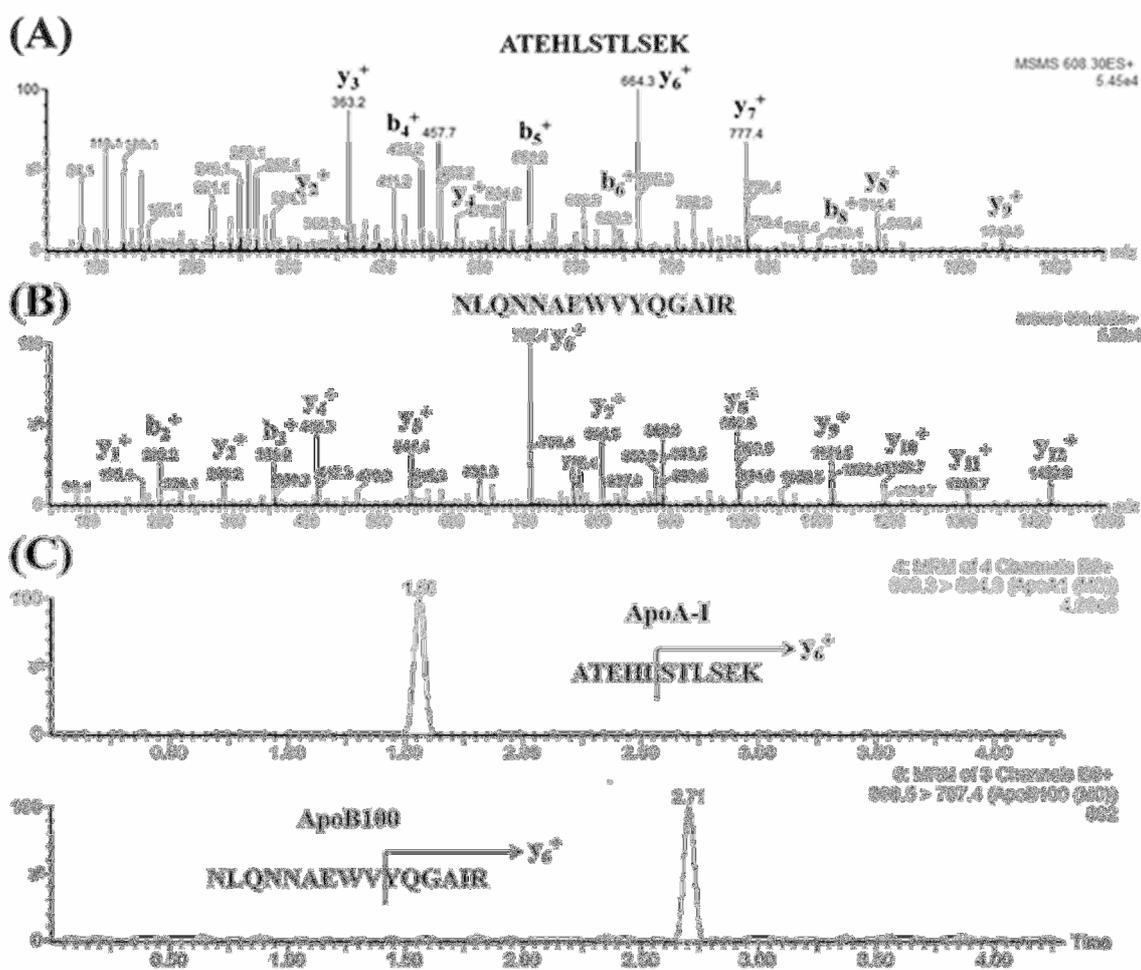
The authors thank the staff of the Clinical Investigation Center of the University Hospital in Nantes, especially Eliane Hiverneau for her invaluable help with patients and blood collection. They also thank Stéphanie Billon-Crossouard and Audrey Aguesse for their technical assistance for developing this method.

#### REFERENCES

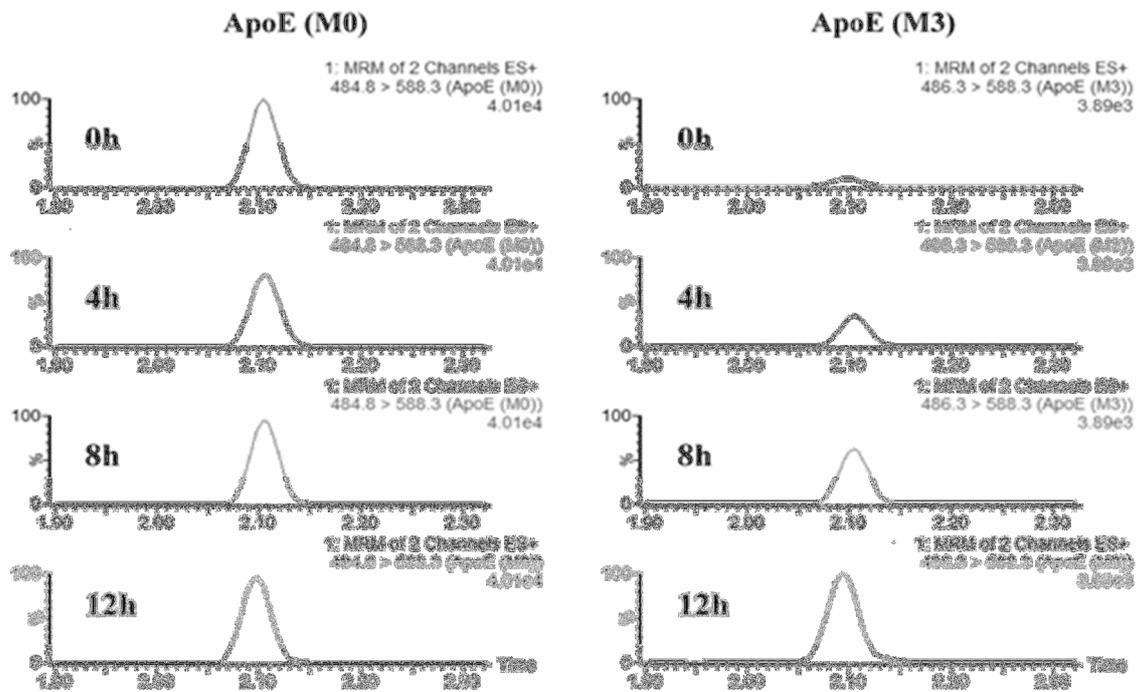
- Foster, D. M., P. H. Barrett, G. Toffolo, W. F. Beltz, and C. Cobelli. 1993. Estimating the fractional synthetic rate of plasma apolipoproteins and lipids from stable isotope data. *J. Lipid Res.* **34**: 2193–2205.
- Lam, S. M., and G. Shui. 2013. Lipidomics as a principal tool for advancing biomedical research. *J. Genet. Genomics.* **40**: 375–390.
- Lichtenstein, A. H., J. S. Cohn, D. L. Hachey, J. S. Millar, J. M. Ordovas, and E. J. Schaefer. 1990. Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein A-I and B-100 kinetics. *J. Lipid Res.* **31**: 1693–1701.
- Barrett, P. H., and G. F. Watts. 2003. Kinetic studies of lipoprotein metabolism in the metabolic syndrome including effects of nutritional interventions. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**: 61–68.
- Matthan, N. R., S. M. Jalbert, S. Lamon-Fava, G. G. Dolnikowski, F. K. Welty, H. R. Barrett, E. J. Schaefer, and A. H. Lichtenstein. 2005. TRL, IDL, and LDL apolipoprotein B-100 and HDL apolipoprotein A-I kinetics as a function of age and menopausal status. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 1691–1696.
- Pan, Y., H. Zhou, A. Mahsut, R. J. Rohm, O. Berejnaia, O. Price, Y. Chen, J. Castro-Perez, M. E. Lassman, D. McLaren, et al. 2014. Static and turnover kinetic measurement of protein biomarkers involved in triglyceride metabolism including apoB48 and apoA5 by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* **55**: 1179–1187.
- Lee, A. Y., N. A. Yates, M. Ichetovkin, E. Deyanova, K. Southwick, T. S. Fisher, W. Wang, J. Loderstedt, N. Walker, H. Zhou, et al. 2012. Measurement of fractional synthetic rates of multiple protein analytes by triple quadrupole mass spectrometry. *Clin. Chem.* **58**: 619–627.
- Lassman, M. E., T. M. McLaughlin, E. P. Somers, A. C. Stefanni, Z. Chen, B. A. Murphy, K. K. Bierilo, A. M. Flattery, K. K. Wong, J. M. Castro-Perez, et al. 2012. A rapid method for cross-species quantitation of apolipoproteins A1, B48 and B100 in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **26**: 101–108.
- Zhou, H., J. Castro-Perez, M. E. Lassman, T. Thomas, W. Li, T. McLaughlin, X. Dan, P. Jumes, J. A. Wagner, D. E. Gutstein, et al. 2013. Measurement of apo(a) kinetics in human subjects using a microfluidic device with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**: 1294–1302.
- Lassman, M. E., T. M. McLaughlin, H. Zhou, Y. Pan, S. M. Marcovina, O. Laterza, and T. P. Roddy. 2014. Simultaneous quantitation and size characterization of apolipoprotein(a) by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**: 1101–1106.
- Ceglarek, U., J. Dittrich, S. Becker, F. Baumann, L. Kortz, and J. Thiery. 2013. Quantification of seven apolipoproteins in human plasma by proteotypic peptides using fast LC-MS/MS. *Proteomics Clin. Appl.* **7**: 794–801.
- Croyal, M., K. Ouguerram, M. Passard, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, S. Billon-Crossouard, A. C. de Gouville, G. Lambert, M. Krempf, and E. Nobécourt. 2015. Effects of extended-release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**: 2042–2047.
- Havel, R. J., H. A. Eder, and J. H. Bragdon. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**: 1345–1353.
- Ouguerram, K., M. Chétiveaux, Y. Zair, P. Costet, M. Abifadel, M. Varret, C. Boileau, T. Magot, and M. Krempf. 2004. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 1448–1453.
- Chétiveaux, M., K. Ouguerram, Y. Zair, P. Maugère, I. Falconi, H. Nazih, and M. Krempf. 2004. New model for kinetic studies of HDL metabolism in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* **34**: 262–267.
- Beghin, L., N. Duhai, P. Poulain, P. Hauw, B. Lacroix, J. M. Lecercf, J. P. Bonte, J. C. Fruchart, and G. Luc. 2000. Measurement of apolipoprotein B concentration in plasma lipoproteins by combining selective precipitation and mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **41**: 1172–1176.
- Brunengraber, H., J. K. Kelleher, and C. Des Rosiers. 1997. Applications of mass isotopomer analysis to nutrition research. *Annu. Rev. Nutr.* **17**: 559–596.
- Frénais, R., K. Ouguerram, C. Maugeais, P. Mahot, P. Maugère, M. Krempf, and T. Magot. 1997. High density lipoprotein apolipoprotein A1 kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia.* **40**: 578–583.
- Bach-Ngohou, K., K. Ouguerram, R. Frénais, P. Maugère, B. Ripolles-Piquer, Y. Zair, M. Krempf, and J. M. Bard. 2005. Influence of atorvastatin on apolipoprotein E and A1 kinetics in patients with type 2 diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**: 363–369.
- Batal, R., M. Tremblay, P. H. Barrett, H. Jacques, A. Fredenrich, O. Mamer, J. Davignon, and J. S. Cohn. 2000. Plasma kinetics of apoC-III and apoE in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *J. Lipid Res.* **41**: 706–718.
- Chan, D. C., G. F. Watts, M. N. Nguyen, and P. H. Barrett. 2006. Factorial study of the effect of n-3 fatty acid supplementation and atorvastatin on the kinetics of HDL apolipoproteins A-I and A-II in men with abdominal obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**: 37–43.
- Maugeais, C., K. Ouguerram, M. Krempf, P. Maugeais, J. Gardette, E. Bigot, and T. Magot. 1996. A minimal model using stable isotopes to study the metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. *Diabetes Metab.* **22**: 57–63.
- Viswanathan, C. T., S. Bansal, B. Booth, A. J. DeStefano, M. J. Rose, J. Sailstad, V. P. Shah, J. P. Skelly, P. G. Swann, and R. Weiner. 2007. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm. Res.* **24**: 1962–1973.
- Bland, J. M., and D. G. Altman. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* **1**: 307–310.
- Jackson, K. G., and C. M. Williams. 2004. Apolipoprotein B-48: comparison of fasting concentrations measured in normolipidemic individuals using SDS-PAGE, immunoblotting and ELISA. *Atherosclerosis.* **176**: 207–217.
- Okubo, K., K. Ikewaki, S. Sakai, N. Tada, Y. Kawaguchi, and S. Mochizuki. 2004. Abnormal HDL apolipoprotein A-I and A-II kinetics in hemodialysis patients: a stable isotope study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**: 1008–1015.
- Frischmann, M. E., K. Ikewaki, E. Trenkwalder, C. Lamina, B. Dieplinger, M. Soufi, H. Schweer, J. R. Schaefer, P. König, F. Kronenberg, et al. 2012. In vivo stable-isotope kinetic study suggests intracellular assembly of lipoprotein(a). *Atherosclerosis.* **225**: 322–327.
- Ooi, E. M., D. T. Chan, G. F. Watts, D. C. Chan, T. W. Ng, G. K. Dogra, A. B. Irish, and P. H. Barrett. 2011. Plasma apolipoprotein C-III metabolism in patients with chronic kidney disease. *J. Lipid Res.* **52**: 794–800.
- Barrett, P. H. R., D. C. Chan, and G. F. Watts. 2006. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J. Lipid Res.* **47**: 1607–1619.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Supplemental Figure S-1.** Characterization of ApoA-I and ApoB100 peptide signatures. **(A)** Product ion spectrum of ATEHLSTLSEK (ApoA-I, doubly charged precursor ion at  $m/z$  608.3). **(B)** Product ion spectrum of NLQNNAEWVYQGAIK (ApoB100, doubly charged precursor ion at  $m/z$  888.5). **(C)** Representative MRM chromatogram obtained from HDL (ApoA-I) and VLDL (ApoB100) fractions after trypsin digestion.



**Supplemental Figure S-2.** Representative MRM chromatograms obtained in HDL samples at four kinetic time points (0, 4, 8, and 12 h) for labeled (right, M3) and unlabeled (left, M0) ApoE peptide (LGPLVEQGR,  $m/z$  484.8  $\rightarrow$  588.3 and 486.3  $\rightarrow$  588.3).



**Supplemental Table S-1.** Variability of the LC/MS/MS method for  $^2\text{H}_3$ -leucine incorporation measurements

Parameters	ApoA-I (HDL)	ApoA-II (HDL)	ApoC-II (HDL)	ApoC-III (HDL)	ApoE (HDL)	ApoB100 (VLDL)
<b>Low level</b>						
<i>Mean <math>\delta</math> enrichment (%)</i>	0.10	0.04	0.62	0.84	0.35	0.41
<i>CV<sub>INTRA</sub> (%)</i>	8.4	10.7	7.7	9.9	8.8	10.5
<i>CV<sub>INTER</sub> (%)</i>	8.6	12.5	11.8	11.7	11.8	10.8
<b>Middle level</b>						
<i>Mean <math>\delta</math> enrichment (%)</i>	0.59	0.65	2.13	2.38	1.86	5.37
<i>CV<sub>INTRA</sub> (%)</i>	7.2	10.4	6.3	7.8	6.8	4.3
<i>CV<sub>INTER</sub> (%)</i>	9.3	10.9	9.1	8.6	7.0	7.7
<b>High level</b>						
<i>Mean <math>\delta</math> enrichment (%)</i>	1.45	1.21	4.67	6.23	5.22	7.72
<i>CV<sub>INTRA</sub> (%)</i>	7.5	9.0	4.8	3.2	5.6	5.3
<i>CV<sub>INTER</sub> (%)</i>	8.3	9.3	9.9	5.4	8.2	6.4

Kinetic time points at 45 min, 6 h and 14 h were chosen to reach low, intermediate and high tracer enrichment levels, respectively. Basal enrichment was subtracted ( $\delta$  enrichment). The validation was performed over three distinct experiments (six replicates per experiment). Pooled HDL from six donors was used for validation of all apolipoproteins except for ApoB100, for which pooled VLDL (six donors) was used. CV<sub>INTRA</sub>, intra-assay coefficient of variation; CV<sub>INTER</sub>, inter-assay coefficient of variation.

**Supplemental Table S-2.** Kinetic parameters of Apos from previous published works using GC/MS method. Values are mean  $\pm$  SEM.

Apo	Subjects	Fractional catabolic rate (pool/day)	Production rate (mg/kg/day)
HDL-ApoA-I	Premenopausal women (n = 8) [1]	0.2 $\pm$ 0.0	11.9 $\pm$ 1.5
	Normal men (n = 5) [2]	0.2 $\pm$ 0.1	12.0 $\pm$ 2.1
	Obese men (n = 12) [3]	0.3 $\pm$ 0.0	14.6 $\pm$ 1.4
	Normal men (n = 5) [4]	0.2 $\pm$ 0.1	12.6 $\pm$ 1.9
	Men /women with type 2 diabetes (n = 7) [5]	0.3 $\pm$ 0.0	14.7 $\pm$ 1.7
HDL-ApoA-II	Obese men (n = 12) [3]	0.2 $\pm$ 0.0	3.9 $\pm$ 0.3
	Normal men (n = 5) [4]	0.2 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.0
VLDL-ApoB100	Premenopausal women (n = 8) [1]	13.3 $\pm$ 3.1	15.5 $\pm$ 1.3
	Normal men (n = 11) [6]	9.2 $\pm$ 1.4	10.4 $\pm$ 1.2
	Normal men (n = 5) [7]	11.5 $\pm$ 1.2	---
	Normal men (n = 9) [8]	16.4 $\pm$ 4.9	45.9 $\pm$ 16.4
	Hypertriglyceridemic men (n = 5) [9]	3.0 $\pm$ 0.0	36.3 $\pm$ 6.5
IDL-ApoB100	Premenopausal women (n = 8) [1]	10.6 $\pm$ 2.4	5.8 $\pm$ 0.9
	Normal men (n = 11) [6]	12.3 $\pm$ 1.3	11.3 $\pm$ 1.1
	Normal men (n = 5) [7]	14.9 $\pm$ 1.9	---
LDL-ApoB100	Premenopausal women (n = 8) [1]	0.4 $\pm$ 0.1	12.3 $\pm$ 2.0
	Normal men (n = 11) [6]	0.6 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 1.0
	Normal men (n = 5) [7]	0.5 $\pm$ 0.1	---
	Normal men (n = 9) [8]	0.4 $\pm$ 0.1	32.6 $\pm$ 9.8
HDL-ApoC-III	Hypertriglyceridemic men (n = 5) [9]	0.3 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.1
VLDL-ApoC-III	Hypertriglyceridemic men (n = 5) [9]	0.5 $\pm$ 0.0	5.4 $\pm$ 0.9
	Normal men/ women (n = 7) [10]	1.3 $\pm$ 0.0	5.9 $\pm$ 0.1
HDL-ApoE	Men /women with type 2 diabetes (n = 7) [5]	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0
	Hypertriglyceridemic men (n = 5) [9]	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1
VLDL-ApoE	Men /women with type 2 diabetes (n = 7) [5]	3.4 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.1
	Hypertriglyceridemic men (n = 5) [9]	2.2 $\pm$ 0.0	4.5 $\pm$ 0.6

---: Maugeais *et al* (7) did not detail production rates of ApoB100 in VLDL/IDL/LDL but reported the global production rate of ApoB100.

## Supplemental references

1. Matthan, N. R., S. M. Jalbert, S. Lamon-Fava, G. G. Dolnikowski, F. K. Welty, H. R. Barrett, E. J. Schaefer, and A. H. Lichtenstein. 2005. TRL, IDL, and LDL apolipoprotein B-100 and HDL apolipoprotein A-I kinetics as a function of age and menopausal status. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**: 1691-1696.
2. Frénais, R., K. Ouguerram, C. Maugeais, P. Mahot, P. Maugère, M. Krempf, and T. Magot. 1997. High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia.* **40**: 578-583.
3. Chan, D. C., G. F. Watts, M. N. Nguyen, and P. H. R. Barrett. 2006. Factorial study of the effect of n-3 fatty acid supplementation and atorvastatin on the kinetics of HDL apolipoproteins A-I and A-II in men with abdominal obesity<sup>1-3</sup>. *Am J Clin Nutr.* **84**: 37-43.
4. Okubo, K., K. Ikewaki, S. Sakai, N. Tada, Y. Kawaguchi, and S. Mochizuki. 2004. Abnormal HDL apolipoprotein A-I and A-II kinetics in hemodialysis patients: a stable isotope study. *J Am Soc Nephrol.* **15**: 1008-1015.
5. Bach-Ngohou, K., K. Ouguerram, R. Frénais, P. Maugère, B. Ripolles-Piquer, Y. Zaïr, M. Krempf, and J. M. Bard. 2005. Influence of atorvastatin on apolipoprotein E and AI kinetics in patients with type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* **315**: 363-369.
6. Ouguerram, K., M. Chetiveaux, Y. Zair, P. Costet, M. Abifadel, M. Varret, C. Boileau, T. Magot, and M. Krempf. 2004. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**: 1448-1453.
7. Maugeais, C., K. Ouguerram, M. Krempf, P. Maugeais, J. Gardette, E. Bigot, and T. Magot. 1996. A minimal model using stable isotopes to study the metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. *Diabetes Metab.* **22**: 57-63.
8. Frischmann, M. E., K. Ikewaki, E. Trenkwalder, C. Lamina, B. Dieplinger, M. Soufi, H. Schweer, J. R. Schaefer, P. König, F. Kronenberg, and H. Dieplinger. 2012. In vivo stable-isotope kinetic study suggests intracellular assembly of lipoprotein(a). *Atherosclerosis.* **225**: 322-327.
9. Batal, R., M. Tremblay, P. H. Barrett, H. Jacques, A. Fredenrich, O. Mamer, J. Davignon, and J. S. Cohn. 2000. Plasma kinetics of apoC-III and apoE in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *J Lipid Res.* **41**: 706-718.
10. Ooi, E. M., D. T. Chan, G. F. Watts, D. C. Chan, T. W. Ng, G. K. Dogra, A. B. Irish, and P. H. Barrett. 2011. Plasma apolipoprotein C-III metabolism in patients with chronic kidney disease. *J Lipid Res.* **52**: 794-800.

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Nous avons validé la méthode multiplexe combinant la protéolyse enzymatique et l'analyse successive de peptides signatures par LC-MS/MS. Cette approche s'est avérée fiable et répétable pour la quantification et la mesure des enrichissements cinétiques (traceur :  $^2\text{H}_3$ -leucine) de six apolipoprotéines humaines majeures (apoA-I, apoA-II, apoB100, apoC-II, apoC-III et apoE) auxquelles nous avons pu ajouter l'apo(a). Pour cette dernière, notre méthode multiplexe permet également d'évaluer son polymorphisme de taille.

Notre approche analytique a été validée selon les critères standards inhérents à toute méthode impliquant la spectrométrie de masse ([Viswanathan et al. 2007](#)), à savoir la spécificité, les limites de détection et de quantification, les répétabilités intra- et inter-expérimentales, la précision (comparaison aux méthodes standards), et la pertinence physiologique (modélisation).

L'élément central de cette méthodologie réside dans le choix du peptide signature, qui doit être spécifique, stable chimiquement et répété de façon invariante au sein de la séquence protéique (quantification) ([Lee et al. 2012](#) ; [Medzihradzsky & Chalkley 2015](#)). En outre, pour les mesures cinétiques, le peptide candidat doit posséder au moins un résidu de traceur (leucine dans notre cas). Pour les protéines peu concentrées ou à faibles taux de renouvellement (enrichissements faibles), il est possible d'amplifier artificiellement le signal LC-MS/MS en choisissant un peptide possédant plusieurs résidus de traceur. Cela permet de générer plusieurs isotopomères dont les signaux seront cumulés lors de la détection. Dès lors, il est nécessaire de connaître le nombre d'isotopomères que les paramètres analytiques permettent de détecter. Nous avons choisi de paramétrer nos transitions MRM (mode MS/MS) de telle sorte que la totalité des isotopomères générés par nos peptides soit détectée. Il est alors aisé de corriger le signal par simple division des données brutes avec le nombre de résidus de traceur présents dans la séquence peptidique ([Brunengraber et al. 1997](#) ; [Lee et al. 2012](#) ; [Zhou et al. 2013](#)). Cette correction est nécessaire pour obtenir les données réelles d'enrichissement et surtout pour pouvoir comparer plusieurs protéines dont les peptides signatures présentent des profils différents. A noter que durant nos étapes de développement, nous n'avons pas été en mesure de détecter les isotopologues de type «  $M + (n \times 3)$  » (avec  $n$  le nombre de leucines et  $n > 1$ ). Nous avons donc considéré ces entités comme minoritaires et donc négligeables.

Notre méthode permet d'étudier sept apolipoprotéines dans le plasma, le sérum et dans les fractions lipoprotéiques (VLDL, IDL, LDL, HDL et Lp(a)). Le fractionnement des

lipoprotéines par ultracentrifugation est un processus long et cette étape expérimentale demeure malheureusement peu compressible. De plus, il est courant d'observer un relargage des apolipoprotéines les moins affines pour les lipides (apoC, apoE...) après ultracentrifugations. Nous avons donc tenté l'alternative de la FPLC, technique plus rapide et plus douce, mais les fractions récoltées étaient beaucoup trop diluées pour l'obtention de données fiables, à l'exception de l'apoA-I (HDL) et de l'apoB100 (LDL). Ces tests parallèles nous ont permis de définir une limite de détection globale autour de 10 à 50 nmol/L (selon les peptides), pour la quantification plasmatique et sérique, et autour de 1 à 5 nmol/L pour la quantification dans les fractions lipoprotéiques (après concentration sur filtres à membranes). Dès lors, cette méthode a pu être appliquée avec succès lors de divers travaux de recherche collaboratifs (Tavori *et al.* 2016 ; Rimbart *et al.* 2016 ; Alonso *et al.* 2016 ; Villard *et al.* 2016 ; **Annexe B**).

Pour des raisons évidentes de sensibilité, des concentrations circulantes 100 à 200 fois supérieures aux seuils de détection sont appréciées pour la mesure des enrichissements cinétiques. Le cas échéant, ces seuils sont un problème qu'il est possible de contourner dans le cas des fractions lipoprotéiques. En effet, les processus d'ultracentrifugation génèrent des volumes importants de fractions (~ 2 mL), relativement propres (peu d'interférences), qu'il est possible de concentrer 5 à 10 fois avec des filtres à membranes (élimination des interférences salines). Malheureusement, ceci n'est pas possible pour les matrices riches en protéines comme le plasma et le sérum. En effet, le signal des protéines faiblement concentrées est souvent masqué par celui des protéines abondantes, et la simple filtration ne permet pas de retirer les protéines interférentes, mais au contraire de les concentrer. L'alternative courante est donc l'immuno-capture spécifique des protéines d'intérêt ou la déplétion des protéines interférentes avant l'étape de protéolyse (Gauthier *et al.* 2015 ; Xie *et al.* 2016). Ces méthodes de purification pré-protéolyse, notamment l'immuno-capture, constituent une voie d'investigation intéressante pour un ensemble de protéines d'intérêt dans les pathologies cardiovasculaires comme l'apo(a), pour les patients présentant des taux très bas de Lp(a), et PCSK9.

## Article 4

### **Plasma PCSK9 measurement by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with conventional ELISA**

Croyal M, Fall F, Krempf M, Thédrez A, Ouguerram K, Ferchaud-Roucher V, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Mata P, Alonso R, Lambert G and Nobécourt E

*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2017**, 1044: 24-29

A la suite des limitations évoquées précédemment pour la détection des protéines peu abondantes, un nouveau défi s'est imposé pour leurs analyses quantitatives et cinétiques. De nombreux travaux décrivent des étapes de pré-concentration de ces protéines par immuno-capture ou déplétion avant l'étape de protéolyse enzymatique, nécessaire à l'analyse par LC-MS/MS. L'utilisation d'anticorps spécifiques pour la capture des protéines étant souvent fastidieuse, nous avons essayé de résoudre cette problématique par des techniques physico-chimiques plus simple, en réalisant une concentration post-protéolyse par extraction en phases solide/liquide ou SPE (*solid-phase extraction*). Nous avons donc développé une méthode LC-MS/MS pour l'analyse spécifique d'une protéine peu abondante jouant un rôle clé dans la régulation du LDL-C : PCSK9 (concentration plasmatique moyenne ~1-5 nmol/L).

Nous avons ainsi confirmé la précision de la LC-MS/MS pour la quantification plasmatique de PCSK9 malgré sa faible abondance. Malheureusement, l'étape SPE ne nous permet toujours pas de mesurer les enrichissements de ce type de protéine, nécessitant des seuils de détection jusqu'à 100 fois plus bas. Le réel avantage de cette nouvelle étape a donc été l'inclusion de PCSK9 à notre méthode multiplexe précédemment décrite.





Short communication

## Plasma PCSK9 measurement by liquid chromatography–Tandem mass spectrometry and comparison with conventional ELISA



Mikaël Croyal<sup>a,b,1</sup>, Fanta Fall<sup>a,1</sup>, Michel Krempf<sup>a,b,c,\*</sup>, Aurélie Thédrez<sup>a,b</sup>,  
 Khadija Ouguerram<sup>a,b</sup>, Véronique Ferchaud-Roucher<sup>a,b</sup>, Audrey Aguesse<sup>a,b</sup>,  
 Stéphanie Billon-Crossouard<sup>a,b</sup>, Pedro Mata<sup>d</sup>, Rodrigo Alonso<sup>d,e</sup>, Gilles Lambert<sup>f,g,h</sup>,  
 Estelle Nobécourt<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France

<sup>b</sup> CRNH0, West Human Nutrition Research Center, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France

<sup>c</sup> Department of Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition, G & R Laennec Hospital, Nantes, France

<sup>d</sup> Spanish Familial Hypercholesterolemia Foundation, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Department of Nutrition, Clínica Las Condes, Santiago, Chile

<sup>f</sup> INSEP, UMR 7188, Santé-Citadin, France

<sup>g</sup> Université de la Réunion, Faculté de Médecine, Saint-Denis, France

<sup>h</sup> CHU de la Réunion, Saint-Denis, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 April 2016

Received in revised form

21 December 2016

Accepted 30 December 2016

Available online 31 December 2016

## Keywords:

Proteotypic peptide analysis

LC–MS/MS

Solid-phase extraction

PCSK9

## ABSTRACT

The combination of liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) and trypsin proteolysis is an effective tool for accurate quantitation of multiple proteins in a single run. However, expensive samples pre-treatment as immunoenrichment are often required to analyze low abundant proteins. Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a circulating regulator of low-density lipoprotein metabolism, was studied as an example of a low abundant plasma protein. We investigated post-proteolysis solid-phase extraction (SPE) as an alternative strategy to improve its detection. After optimization of pretreatment, including denaturation, reduction, alkylation, tryptic digestion and selective SPE concentration, 91 ± 7% of PCSK9 was recovered from human plasma samples and coefficients of variation were less than 13.2% with a lower limit of quantification of 37.5 ng/ml. This LC–MS/MS method was compared with standard enzyme-linked immunosorbent assay in 30 human plasma samples with a broad range of PCSK9 concentrations. Both methods were significantly correlated ( $r = 0.936$ ,  $p < 0.001$ ) with less than 7% of the values out of the 95% confidence interval and similar concentrations were measured using either LC–MS/MS or ELISA methods ( $514.2 \pm 217.2$  vs.  $504.2 \pm 231.0$  ng/ml, respectively;  $p = \text{NS}$ ). This method involving SPE is an effective measurement tool for low abundant plasma protein analysis that could be easily included in multiplexed assays.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; rPCSK9, recombinant PCSK9; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LDL, low-density lipoprotein; LDL-C, LDL cholesterol; AB, ammonium bicarbonate; DTT, dithiothreitol; IA, iodoacetamide; SDC, sodium deoxycholate; IS, internal standard; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

\* Corresponding author at: 8, Quai Moncousu, 44000 Nantes, France.

E-mail addresses: [mikael.croyal@univ-nantes.fr](mailto:mikael.croyal@univ-nantes.fr) (M. Croyal), [falfanta92@gmail.com](mailto:falfanta92@gmail.com) (F. Fall), [michel.krempf@univ-nantes.fr](mailto:michel.krempf@univ-nantes.fr) (M. Krempf), [aurelie.thedrez@univ-nantes.fr](mailto:aurelie.thedrez@univ-nantes.fr) (A. Thédrez), [khadija.ouguerram@univ-nantes.fr](mailto:khadija.ouguerram@univ-nantes.fr) (K. Ouguerram), [veronique.ferchaud-roucher@univ-nantes.fr](mailto:veronique.ferchaud-roucher@univ-nantes.fr) (V. Ferchaud-Roucher), [audrey.aguesse@univ-nantes.fr](mailto:audrey.aguesse@univ-nantes.fr) (A. Aguesse), [stephanie.crossouard@univ-nantes.fr](mailto:stephanie.crossouard@univ-nantes.fr) (S. Billon-Crossouard), [pemata@telefonica.net](mailto:pemata@telefonica.net) (P. Mata), [rodrigoalonsok@gmail.com](mailto:rodrigoalonsok@gmail.com) (R. Alonso), [gilles.lambert@univ-reunion.fr](mailto:gilles.lambert@univ-reunion.fr) (G. Lambert), [estelle.nobecourt-dupuy@univ-nantes.fr](mailto:estelle.nobecourt-dupuy@univ-nantes.fr) (E. Nobécourt).

<sup>1</sup> Equal contribution.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.040>  
 1570-0232/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Enzymatic proteolysis of proteins by endopeptidases and subsequent targeted analysis of signature peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has recently shown to be a powerful method to assay plasma proteins [1–3]. Unlike usual immunoassays, LC-MS/MS methods can easily be multiplexed for accurate quantification of several proteins in a single run [3,4]. This method can also provide additional information such as protein polymorphisms [5,6]. In addition, mass spectrometry can be also used for stable isotope enrichment measurements in kinetic studies after administration of a stable labeled precursor [2,4,7]. However, for proteins with low plasma concentrations, a preparation of the samples before proteolysis (e.g. by immunoaffinity concentration or immunodepletion) is required to allow accurate mass spectrometry analysis [8–10]. Although effective, this preparation is expensive, complex, and often time consuming to allow combined analysis of several proteins in single runs.

Here, we describe a simple method based on a post-proteolysis concentration of peptides by solid-phase extraction (SPE). This method was developed and validated on the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a low abundant plasma protein (normal range ~100–200 ng/ml or 1.3–2.6 nM) known to be a key regulator of low-density lipoprotein [11–13].

## 2. Experimental section

### 2.1. Chemicals and reagents

UPLC/MS-grade acetonitrile, water, methanol and 96% formic acid were purchased from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Ammonium bicarbonate (AB), dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IA), sodium deoxycholate (SDC), trypsin, ammonium hydroxide (NaOH), trifluoroacetic acid (TFA), and 37% hydrochloric acid (HCl) were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Synthetic peptides GTVSGTLIGLEFIR, GTVSGTLIGLEFI-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>]-R and recombinant PCSK9 (rPCSK9) were purchased from Thermo Scientific Biopolymers (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Human samples

Plasma samples were obtained from 30 patients (63% males, age 26–60 years) with molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia (FH), and on stable chronic lipid lowering treatment, from the SAFEHEART study, selected to cover a broad range of PCSK9 plasma concentrations (183–1170 ng/ml, i.e. 2.4–15.6 nM) assessed with a commercial ELISA (R&D Systems, Lille, France). All patients gave a written informed consent for any study on lipoprotein metabolism.

### 2.3. LC-MS/MS

Peptide candidate (GTVSGTLIGLEFIR) was selected to maximize sensitivity, specificity, and stability [4,6], dissolved and then diluted in 50% acetonitrile containing 0.1% formic acid as recommended by the manufacturer to produce eight standard solutions at 200, 100, 50, 25, 10, 5, 1 and 0.5 nM (PCSK9 equivalent: 15,000–7500–3750–1875–750–375–75–37.5 ng/ml). Labeled GTVSGTLIGLEFI-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>]-R peptide was used as internal standard (IS) and 25 µl of IS solution (20 µM in 50% acetonitrile containing 0.1% formic acid) were extemporaneously added to 50 ml of a reduction buffer (pH 8) containing 55 mM AB, 0.5% SDC, and 5.5 mM DTT. Plasma samples (100 µl) and standard solutions (100 µl) were added to 900 µl of reduction buffer containing IS. Samples were reduced for 30 min at 60 °C then alkylated with 10 µl

of fresh IA solution (1 M in 1 M NaOH) for 60 min at room temperature (protected from light). Samples were digested for 14 h with 50 µl of trypsin solution (0.1 mg/ml in 1 mM HCl), and 50 µl of 2% TFA were added to stop the digestion. Samples (1 ml) were cleaned, desalted and concentrated using 30 mg Oasis HLB 1 cc Cartridges (Waters, Milford, MA, USA). The cartridges were conditioned with 1 ml of methanol and equilibrated with 1 ml of water. After sample loading, washings with 1 ml 5% methanol and 1 ml 20% methanol were performed. Samples were finally eluted with 500 µl of 80% methanol, dried in a stream of nitrogen (40 °C) and reconstituted with 100 µl of 25% acetonitrile containing 0.1% formic acid. Samples were finally centrifuged for 5 min at 4 °C (20,000g) and the clear supernatant was injected into the LC-MS/MS system.

Analyses were performed on a Xevo<sup>®</sup> Triple-Quadrupole mass spectrometer with an electrospray ionization (ESI) interface equipped with an Acquity H-Class<sup>®</sup> UPLC<sup>™</sup> device (Waters Corporation, Milford, MA, USA) as described in Table 1. Chromatographic peak area ratios between GTVSGTLIGLEFIR and IS constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves. PCSK9 plasma concentrations were expressed in nM assuming 1 mol of peptide equivalent to 1 mol of protein. Concentrations could be thus converted to ng/ml assuming a molecular weight of 75 kDa [14].

### 2.4. Optimization of sample preparation

The method was developed using a pool of plasma from eight donors spiked either with rPCSK9 (final concentration 10 nM or 750 ng/ml) or AB buffer (50 mM, pH 8) for basal level evaluation. Solutions of synthetic peptide (10 nM in AB buffer) were used to assess the full recovery and basal concentrations were subtracted to measured concentrations in spiked plasma samples. For trypsin proteolysis, 3 concentrations (5 µg or 0.02 mg/ml, 25 µg or 0.1 mg/ml and 50 µg or 0.2 mg/ml) and 6 incubation times (1, 2, 4, 6, 14 and 24 h) were assessed. For solid-phase extraction, wash and elution conditions were optimized with increasing levels of methanol or acetonitrile in water. Several mixtures of acetonitrile in water containing 0.1% of formic acid were tested to reconstitute sample after drying. Each condition was tested in 3 experimental replicates and results were expressed as mean ± standard deviation (SD). After selection of the optimal experimental conditions, the assay was conducted on 6 individual plasma and serums (3 males and 3 females for each) spiked either with rPCSK9 (final concentrations 0.5, 2.5, 7.5 and 15 nM, i.e. 37.5, 187.5, 562.5 and 1125.0 ng/ml) or AB buffer (50 mM, pH 8) for basal level evaluation.

### 2.5. Method evaluation

The performance of the method was first assessed for repeatability and accuracy by using pools of plasma spiked with rPCSK9: 0 nM (basal level), 2.5 nM (187.5 ng/ml), 7.5 nM (562.5 ng/ml) and 15 nM (1125 ng/ml). The inter- and intra-assay repeatability was assessed in 3 independent experiments with 6 replicates per samples, and was expressed by the coefficient of variation (CV, %). Both expected and measured concentrations were compared.

Cross-validation was performed by comparing results obtained by standard ELISA and LC-MS/MS on plasma samples from 30 patients. For quantitative experiments, plasma samples spiked with 5 nM (375 ng/ml) of rPCSK9 (n=3) or AB buffer (n=3) were used to check the completion of the enzymatic reaction. Paired results were analyzed using a Student's *t*-test. Pearson correlation tests and a Bland-Altman plots were generated to compare both methods [15]. Graphics and statistical analyses were achieved with GraphPad Prism software (version 6.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

**Table 1**  
Summary of LC–MS/MS conditions.

Column	Acquity <sup>®</sup> UPLC™ BEH C <sub>18</sub> , (1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm)
Mobile phase A	0.1% formic acid in 5/95 (acetonitrile/water; v/v)
Mobile phase B	0.1% formic acid in acetonitrile
Linear gradient	B% = 1% (1 min) for equilibration, then 1–95% of mobile phase B in 5 min, B% = 95% (1 min), return to initial conditions in 1 min and B% = 1% (2 min) for equilibration.
Flow rate	200 μl/min
Injection volume	10 μl
Column temperature	60 °C
Polarity	Positive ESI
Capillary voltage	3 kV
Desolvation gas flow	500 l/h
Cone gas flow	5 l/h
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	400 °C
Desolvation gas	Dinitrogen N <sub>2</sub>
CID gas	Argon
MRM transitions	GTVSGTLIGLEFIR: m/z 731.8 → 734.6 GTVSGTLIGLEFI-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]-R: m/z 736.8 → 744.6
Cone/collision voltages	30 V/30 V

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Selection of peptide marker

From the *in silico* analysis of proteotypic peptides, 9 candidates were selected [4]. The GTVSGTLIGLEFIR peptide was selected directly from rPCSK9 digest and was in agreement with previous studies [8–10]. GTVSGTLIGLEFIR was mainly detected as a doubly charged precursor ion at *m/z* 731.8, yielding more than 13 specific and singly charged product ions after MS/MS fragmentations (Fig. 1A). The complete characterization of the fragmentation patterns allowed unambiguous identification of the peptide sequence. The most intense product ion at *m/z* 734.6 (*y*<sub>6</sub><sup>+</sup>) was selected for multiple reaction monitoring (MRM) transitions leading to the specific detection of the target peptide in biological samples (Fig. 1B–E).

#### 3.2. Optimization of sample preparation

As previously reported [4,6], trypsin digestion efficiency for plasma apolipoproteins was enhanced with the combination of sodium deoxycholate, dithiothreitol and iodoacetamide as detergent, reducing agent and alkylating agent, respectively [1,4]. Trypsin proteolysis and SPE were adjusted to maximize sensitivity and specificity. The main modification [4] was the sample size (100 μl) which was increased to reach appropriate limits of detection. As a consequence, proteolysis conditions were adjusted to maximize efficiency. As shown in Fig. 2A and B, reliable recoveries (82 ± 11%) were obtained with 25 μg of trypsin and 14 h of incubation (82 ± 7%) whereas the conventional enzyme/protein ratio was not respected [3,4]. Thus, this protocol led to high sample volumes (~1 ml) easily concentrated by SPE. Regarding elution, methanol was more stringent than acetonitrile for sample cleaning (not shown), allowing the inclusion of 2 wash steps (Fig. 2C), which improved the selective extraction of the peptide. Recoveries were calculated by comparing plasma sample spiked with rPCSK9 with standard solutions of the synthetic peptide. After normalization with the labelled IS, the recovery was of 91 ± 7% allowing the use of the synthetic peptide as calibrators for quantitative analysis. After SPE, cleaned samples were dried under nitrogen. Several mixtures of mobile phase B in mobile phase A were assessed for sample reconstitution (Fig. 2D) for best signal intensity. The use of 25% acetonitrile containing 0.1% formic acid increased the signal obtained 4-fold compared with aqueous solution [3,4]. With higher amount of acetonitrile, peak distortions were observed with a loss in chromatographic resolution.

The optimal parameters were finally validated on 6 individual plasma and serum samples, overloaded with different levels of rPCSK9 (0.5, 2.5, 7.5 and 15 nM, i.e. 37.5, 187.5, 562.5 and 1125.0 ng/ml). Recoveries were into the range 89.8–100.2% with a high reproducibility (CV < 6.4%, n = 6).

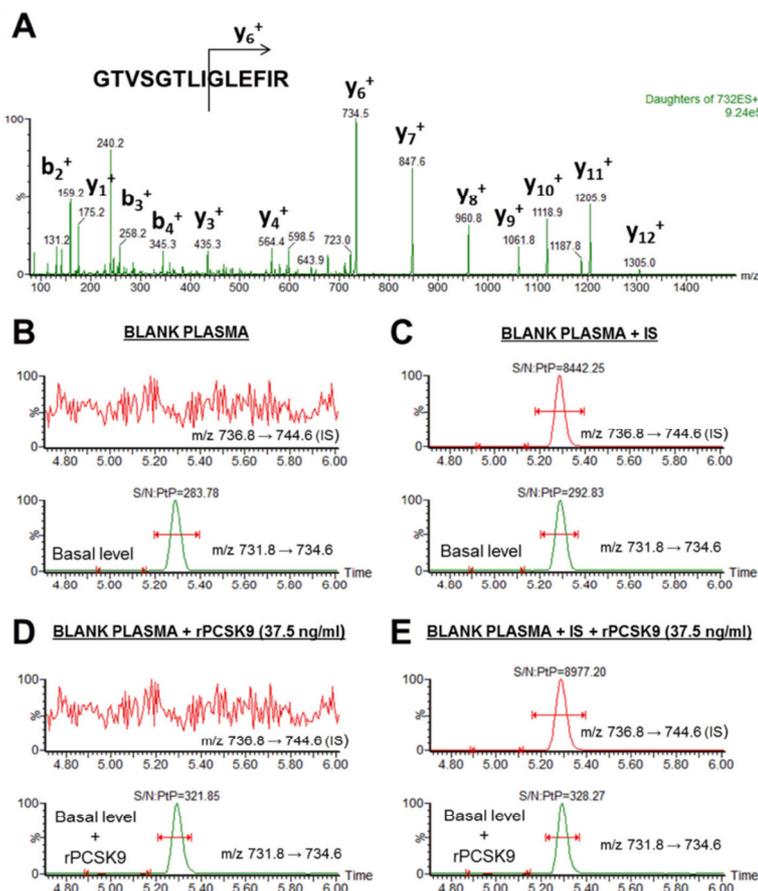
#### 3.3. Method validation

To test the linearity of the method, a regression model (1/x weighting and origin excluded) was used. After analysis of the 6 calibration curves (two calibration curves per experiment), the mean *r*<sup>2</sup> value was 0.993 ± 0.002 and the CVs never exceeded 13.5% over the concentration range tested. Intra- and inter-assay precision and accuracy parameters were assessed using calibration curves and pools of plasma spiked with different levels of rPCSK9. As shown in Table 2, intra- and inter-assay CVs never exceeded 13.2% and the mean absolute measured concentrations (mean bias) did not deviate by more than 10.1% compared with expected concentrations. These results are within conventional acceptance criteria for LC–MS/MS based assays [16] and underlined that the synthetic signature peptide could be used to accurately quantify circulating PCSK9 without correction.

This method was thus able to quantify plasma PCSK9 without expensive treatments prior trypsin proteolysis, such as immunoprecipitation [8–10] or plasma depletion involving supplemental equipment and higher sample volumes [17–19]. With minimal sample volumes (100 μl), we were able to get similar lower limit of quantification compared to immunoprecipitation or plasma depletion [10,17–19]. Using SPE for sample clean-up, this limit was decreased from 15 to 0.5 nM (data not shown).

#### 3.4. Comparison of LC–MS/MS with conventional ELISA

For method comparison, we used control plasma samples spiked with rPCSK9 to assess the completion of enzymatic reaction. After subtraction of the basal level, the mean bias calculated between both: expected and theoretical concentration was of –5.2%, thus validating the experiment. PCSK9 plasma concentrations obtained were not statistically different when assayed by LC–MS/MS or ELISA (6.9 ± 2.9 vs. 6.7 ± 3.1 nM or 514.2 ± 217.2 vs. 504.2 ± 231.0 ng/ml, respectively). As shown in Fig. 3A, a significant correlation was observed (*y* = 0.88 × *x* + 70.45; *r* = 0.936; *p* < 0.0001) between both methods. In the Bland–Altman test, the mean of both concentrations obtained by LC–MS/MS and ELISA was calculated and plotted against the difference between both measurements. The mean difference and the limits of similarity, corresponding to the 95% of



**Fig. 1.** (A) Product ion spectrum of PCSK9 proteotypic peptide (precursor: doubly charged ion at  $m/z$  731.8) obtained from a tryptic digest of rPCSK9 (10  $\mu\text{g/ml}$ ). (B) MRM chromatogram obtained for a plasma tryptic digest, (C) MRM chromatogram obtained for a plasma tryptic digest spiked with IS, (D) MRM chromatogram obtained for a plasma tryptic digest spiked with rPCSK9 at 37.5 ng/ml, and (E) MRM chromatogram obtained for a plasma tryptic digest spiked with rPCSK9 at 37.5 ng/ml and IS. The same pool of 8 donors was used for all MRM chromatograms and the basal level was of 532.5 ng/ml. GTVSGTLIGLEFIR:  $m/z$  731.8  $\rightarrow$  734.6 and GTVSGTLIGLEFIR- $[\text{}^{13}\text{C}_6, \text{}^{15}\text{N}_4]\text{-R}$ :  $m/z$  736.8  $\rightarrow$  744.6 (IS).

**Table 2**

LC-MS/MS method validation for PCSK9 quantification in plasma. The validation was performed over 3 distinct experiments using 6 replicates per level and per experiment. Values are mean  $\pm$  SD.

Spiked (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Mean Bias (%)	Intra-assay CV (%)	Inter-assay CV (%)
0	532.5 $\pm$ 59.9	unknown	n/c	10.3	10.6
187.5	765.0 $\pm$ 89.8	727.5 $\pm$ 7.7	5.4	11.9	11.8
562.5	1,245.1 $\pm$ 165.2	14.7 $\pm$ 7.5	10.1	10.7	13.2
1,125.0	1,672.5 $\pm$ 120.3	22.2 $\pm$ 7.4	0.7	6.6	7.1

CV: coefficient of variation, n/c: not calculated

confidence (i.e. mean  $\pm$  1.96  $\times$  SD), were drawn (Fig. 3B) with 28 out of 30 values within these limits.

#### 4. Conclusions

We here developed and validated a simple and fast LC-MS/MS method to quantify PCSK9 in plasma samples into the range 37.5–15,000 ng/ml (0.5–200 nM). Unlike most conventional LC-MS/MS based assays for low abundant proteins, protein concentration by immunoaffinity or immunodepletion was not necessary. This method could be implemented for quantitation

in a single mass spectrometry run of other low abundant plasma proteins.

#### Conflict of interest disclosure

The authors declare no financial conflicts of interest.

#### Acknowledgments

We are grateful to the Biogenouest CORSAIRE core facility for their financial support, to the Spanish Familial Hypercholes-

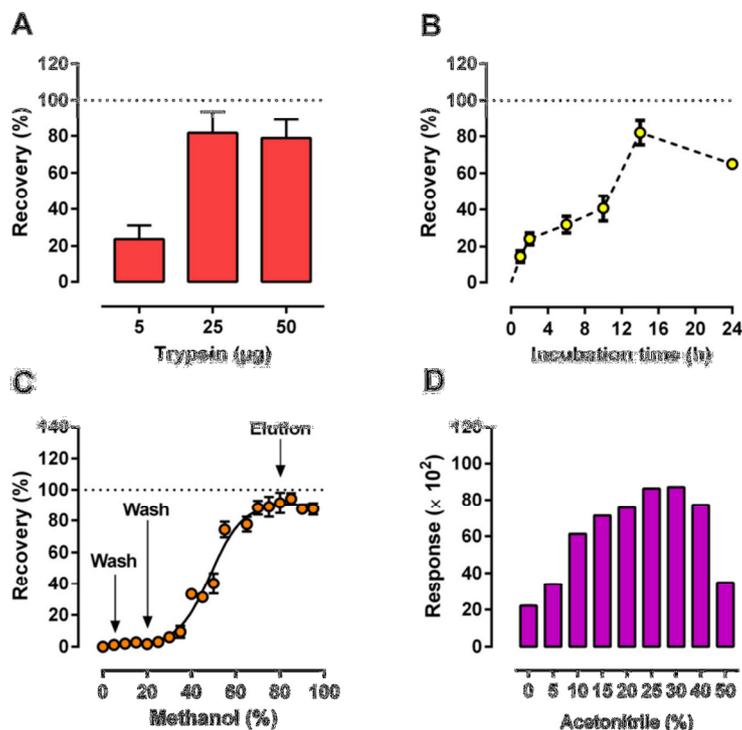


Fig. 2. Development of the experimental procedure. (A) Optimization of trypsin amounts (incubation: 14 h), (B) optimization of trypsin incubation time (trypsin: 25 µg), (C) optimization of the sample clean-up by solid-phase extraction and (D) optimization of the solvent composition to reconstitute dried samples. Values are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

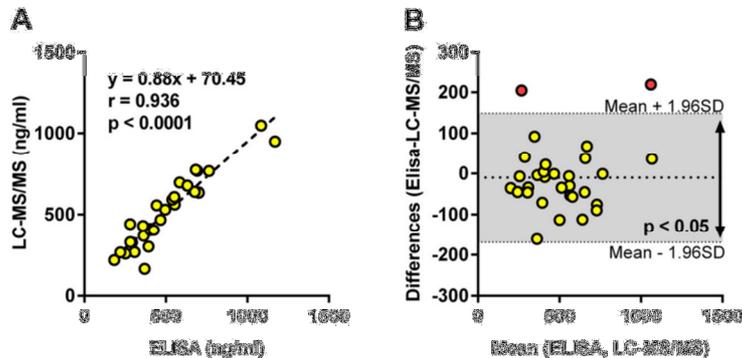


Fig. 3. (A) Linear correlation obtained between ELISA and LC-MS/MS for PCSK9 plasma concentration measurements. (B) Comparison of both methods using the Bland-Altman test.

terolemia Foundation and to FISS PI12/01289 from Instituto de Salud Carlos III (ISIII).

#### References

- [1] M.E. Lassman, T.M. McLaughlin, E.P. Somers, A.C. Stefanni, Z. Chen, B.A. Murphy, K.K. Bierilo, A.M. Flattery, K.K. Wong, J.M. Castro-Perez, B.K. Hubbard, T.P. Roddy, A rapid method for cross-species quantitation of apolipoproteins A1, B48 and B100 in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 101–108.
- [2] A.Y.H. Lee, N.A. Yates, M. Ichetovkin, E. Deyanova, K. Southwick, T.S. Fisher, W. Wang, J. Loderstedt, N. Walker, H. Zhou, X. Zhao, C.P. Sparrow, B.K. Hubbard, D.J. Rader, A. Sitlani, J.S. Millar, R.C. Hendrickson, Measurement of fractional

synthetic rates of multiple protein analytes by triple quadrupole mass spectrometry, *Clin. Chem.* 58 (2012) 619–627.

- [3] U. Ceglarek, J. Dittrich, S. Becker, F. Baumann, L. Körtz, J. Thiery, Quantification of seven apolipoproteins in human plasma by proteotypic peptides using fast LC-MS/MS, *Proteom. Clin. Appl.* 7 (2013) 794–801.
- [4] M. Croyal, F. Fall, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, Y. Zair, K. Ouguerram, M. Krempf, E. Nobécourt, Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS, *J. Lipid Res.* 57 (2016) 509–515.
- [5] M.E. Lassman, T.M. McLaughlin, H. Zhou, Y. Pan, S.M. Marcovina, O. Laterza, T.P. Roddy, Simultaneous quantitation and size characterization of apolipoprotein(a) by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 1101–1106.
- [6] M. Croyal, K. Ouguerram, M. Passard, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, S. Billon-Crossouard, A.-C. de Gouville, G. Lambert, M. Krempf, E. Nobécourt,

- Effects of extended-release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2015) 2042–2047.
- [7] Y. Pan, H. Zhou, A. Mahsut, R.J. Rohm, O. Berejinaia, O. Price, Y. Chen, J. Castro-Perez, M.E. Lassman, D. McLaren, J. Conway, K.K. Jensen, T. Thomas, G. Reyes-Soffer, H.N. Ginsberg, D.E. Gutstein, M. Cleary, S.F. Previs, T.P. Roddy, Static and turnover kinetic measurement of protein biomarkers involved in triglyceride metabolism including apoB48 and apoA5 by LC/MS/MS, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 1179–1187.
- [8] M.E. Lassman, T. McAvoy, A.Y.H. Lee, D. Chappell, O. Wong, H. Zhou, G. Reyes-Soffer, H.N. Ginsberg, J.S. Millar, D.J. Rader, D.E. Gutstein, O. Laterza, Practical immunoaffinity-enrichment LC–MS for measuring protein kinetics of low-abundance proteins, *Clin. Chem.* 60 (2014) 1217–1224.
- [9] M.-S. Gauthier, J.R. Pérusse, Z. Awan, A. Bouchard, S. Tessier, J. Champagne, B. Krastins, G. Byram, K. Chabot, P. Garneau, R. Rabasa-Lhoret, D. Faubert, M.F. Lopez, N.G. Seidah, B. Coulombe, A semi-automated mass spectrometric immunoassay coupled to selected reaction monitoring (MSIA-SRM) reveals novel relationships between circulating PCSK9 and metabolic phenotypes in patient cohorts, *Methods* 81 (2015) 66–73.
- [10] B. Krastins, A. Prakash, D.A. Sarracino, D. Nedelkov, E.E. Niederkofler, U.A. Kiernan, R. Nelson, M.S. Vogelsang, G. Vadali, A. Garces, J.N. Sutton, S. Peterman, G. Byram, B. Darbouret, J.R. Pérusse, N.G. Seidah, B. Coulombe, J. Gobom, E. Portelius, J. Pannee, K. Blennow, V. Kulasingam, L. Couchman, M.F. Moniz, C. Lopez, Rapid development of sensitive, high-throughput, quantitative and highly selective mass spectrometric targeted immunoassays for clinically important proteins in human plasma and serum, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 399–410.
- [11] G. Dubuc, M. Tremblay, C. Paré, H. Jacques, J. Hamelin, S. Benjannet, L. Boulet, J. Genest, L. Bernier, N.G. Seidah, J. Davignon, A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 140–149.
- [12] B. Gencer, G. Lambert, F. Mach, PCSK9 inhibitors, *Swiss Med. Wkly.* 145 (2015) w14094.
- [13] A. Denegri, I. Petrova-Slater, E. Pasotti, M.G. Rossi, G.B. Pedrazzini, T. Moccetti, M. Moccetti, PCSK9 inhibitors: an overview on a new promising lipid-lowering therapy, *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)* 17 (2016) 237–244.
- [14] N.G. Seidah, Z. Awan, M. Chrétien, M. Mbikay, PCSK9: a key modulator of cardiovascular health, *Circ. Res.* 114 (2014) 1022–1036.
- [15] J.M. Bland, D.G. Altman, Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet Lond. Engl.* 1 (1986) 307–310.
- [16] C.T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A.J. DeStefano, M.J. Rose, J. Sailstad, V.P. Shah, J.P. Skelly, P.G. Swann, R. Weiner, Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1962–1973.
- [17] H. Keshishian, T. Addona, M. Burgess, D.R. Mani, X. Shi, E. Kuhn, M.S. Sabatine, R.E. Gerszten, S.A. Carr, Quantification of cardiovascular biomarkers in patient plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution, *Mol. Cell. Proteom.* 8 (2009) (2339–2249).
- [18] M.W. Burgess, H. Keshishian, D.R. Mani, M.A. Gillette, S.A. Carr, Simplified and efficient quantification of low-abundance proteins at very high multiplex via targeted mass spectrometry, *Mol. Cell. Proteom.* 13 (2014) 1137–1149.
- [19] S.E. Abbatiello, B. Schilling, D.R. Mani, L.J. Zimmerman, S.C. Hall, B. MacLean, M. Albertolle, S. Allen, M. Burgess, M.P. Cusack, M. Gosh, V. Hedrick, J.M. Held, H.D. Inerowicz, A. Jackson, H. Keshishian, C.R. Kinsinger, J. Lyssand, L. Makowski, M. Mesri, H. Rodriguez, P. Rudnick, P. Sadowski, N. Sedransk, K. Shaddock, S.J. Skates, E. Kuhn, D. Smith, J.R. Whiteaker, C. Whitwell, S. Zhang, C.H. Borchers, S.J. Fisher, B.W. Gibson, D.C. Liebler, M.J. MacCoss, T.A. Neubert, A.G. Paulovich, F.E. Regnier, P. Tempst, S.A. Carr, Large-scale interlaboratory study to develop, analytically validate and apply highly multiplexed quantitative peptide assays to measure cancer-relevant proteins in plasma, *Mol. Cell. Proteom.* 14 (2015) 2357–2374.

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Cette étude nous a permis d'inclure l'étape SPE dans notre protocole standard multiplexe par LC-MS/MS, et l'approche analytique a été validée une fois de plus selon les critères conventionnels des analyses par spectrométrie de masse ([Viswanathan et al. 2007](#)).

Au terme de ce développement, l'étape SPE s'est montrée réellement efficace pour l'analyse spécifique de PCSK9, mais également pour l'analyse globale d'autres protéines d'intérêt. Cette étape d'extraction améliore en effet les seuils de sensibilité (volume de plasma initial plus important) ainsi que la répétabilité du dosage. Dès lors, nous avons inclus cette étape à notre protocole standard multiplexe. Nous avons ainsi développé une méthode SPE générique en mesure d'extraire chaque protéine ciblée selon la même procédure. Les temps et coûts expérimentaux ont également été optimisés.

Entre la décongélation de l'échantillon et l'injection LC-MS/MS, 7 heures sont nécessaires contre 24 auparavant, et l'analyse d'un échantillon revient à environ 8,50 euros en matériel. Notre méthode multiplexe permet aujourd'hui l'analyse simultanée de dix-sept protéines très largement impliquées dans le métabolisme des lipides (soit 0,40 euros / protéine / échantillon). Cependant, nous ne sommes toujours pas en capacité de réaliser les mesures d'enrichissement de certaines d'entre elles comme l'apo(a) de patients à taux très bas, l'apoB48 qui nécessite parfois de gros volumes de fraction de CM, l'apoA-V qui serait un pool précurseur très intéressant du fait de son taux de renouvellement très rapide, et d'autres comme PCSK9/CETP/LCAT/PLTP.

Face aux limites techniques rencontrées pour la mesure des enrichissements des protéines faiblement abondantes, nous avons essayé d'inclure au protocole une étape de purification par immuno-déplétion afin de pouvoir utiliser de plus grands volumes d'échantillon et augmenter ainsi nos seuils de détection ([Keshishian et al. 2009](#)). Contrairement au principe d'immuno-capture, cette méthode utilise des anticorps spécifiques des protéines les plus abondantes du plasma, comme l'albumine et les immunoglobulines, afin de les retirer à cause de leur pouvoir interférent. Cette méthode, bien que fonctionnelle, ne nous a pas permis d'atteindre nos objectifs pour PCSK9.

Aussi, nous développons actuellement une étape d'immuno-capture de PCSK9 avant protéolyse. Le type de support (billes magnétiques) ainsi que l'anticorps spécifique de PCSK9 (murin) ont été sélectionnés et la densité de greffage anticorps sur billes optimisée. Nous sommes actuellement en train d'établir les conditions optimales de capture de PCSK9. Notre but final sera de développer une méthode standard multiplexe, impliquant une immuno-

capture mixte, pour les protéines peu abondantes afin de pouvoir réaliser l'analyse statique et dynamique de ces dernières par LC-MS/MS.

## Article 5

### **Fenofibrate decreases plasma ceramides in type 2 diabetic patients: a novel marker for CVD?**

Croyal M, Kaabia Z, León L, Ramin-Mangata S, Baty T, Fall F, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Hollstein T, Sullivan DR, Nobecourt E, Lambert G, Krempf M

Accepté par le Journal *Diabetes and Metabolism* le 13 avril 2017,

Bien que le Fenofibrate réduise les facteurs de risque d'accidents cardiovasculaires, son réel bénéfice sur ces pathologies reste controversé. Seuls quelques sous-groupes de patients présentant un risque plus élevé de maladies cardiovasculaires ont illustré son efficacité. Nous avons donc émis l'hypothèse que les marqueurs conventionnels utilisés lors de ces méta-analyses ne sont pas en mesure d'expliquer totalement cette hétérogénéité de réponse. Nous avons choisi de réaliser une analyse lipidomique non-ciblée par LC-HRMS, chez des patients diabétiques avant et après traitement Fénofibrate, dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs lipidiques. Aucun des patients sélectionnés (n = 102, étude FIELD) n'a été traité avec un traitement hypolipémiant autre que le Fénifibrate durant cette phase d'étude.

Notre approche non-ciblée nous a permis de mettre en évidence une très nette baisse des céramides plasmatiques après traitement. Cette observation a été confortée par une analyse LC-MS/MS quantitative, et 73 % des patients étudiés ont été concernés par cette réduction. En outre, seules les plus fortes concentrations basales de sphingolipides ont été significativement associées à cette réduction. Le Fénofibrate activant le PPAR $\alpha$ , un régulateur clé du métabolisme des lipoprotéines, nous avons également appliqué notre méthode multiplexe pour la quantification des principales apolipoprotéines plasmatiques. Nos résultats ont montré que la diminution des céramides plasmatiques était probablement la conséquence de plusieurs mécanismes liés à leur synthèse, leur transport et leur catabolisme. Plusieurs travaux ont préalablement montré une élévation des céramides dans le cas de dyslipidémie et leur implication dans les pathologies cardiovasculaires. La diminution mesurée ici étant indépendante de la plupart des paramètres lipidiques usuels, notre étude suggère que les céramides pourraient être de nouveaux marqueurs d'intérêt dans l'évaluation de l'incidence cardiovasculaire après un traitement au Fénofibrate.





Available online at  
**ScienceDirect**  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
 www.em-consulte.com



Original article

## Fenofibrate decreases plasma ceramide in type 2 diabetes patients: A novel marker of CVD?

M. Croyal<sup>a,b,\*</sup>, Z. Kaabia<sup>b,1</sup>, L. León<sup>a,i,1</sup>, S. Ramin-Mangata<sup>c,d</sup>, T. Baty<sup>b</sup>, F. Fall<sup>b</sup>,  
 S. Billon-Crossouard<sup>a,b</sup>, A. Aguesse<sup>a,b</sup>, T. Hollstein<sup>e</sup>, D.R. Sullivan<sup>f</sup>, E. Nobecourt<sup>c,d,g</sup>,  
 G. Lambert<sup>c,d,\*</sup>, M. Krempf<sup>a,b,h</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR 1280, physiologie des adaptations nutritionnelles, 44000 Nantes, France

<sup>b</sup> CRNHO, West human nutrition research center, CHU, 44000 Nantes, France

<sup>c</sup> INSERM, UMR 1188 D&TROI, 97400 Sainte-Clotilde, France

<sup>d</sup> Faculté de médecine, université de La Réunion, 97400 Saint-Denis, France

<sup>e</sup> Interdisziplinäres Stoffwechsel Centrum Arbeitsbereich Lipidstoffwechsel, Charité Campus Wirochow Klinikum, 1000 Berlin, Germany

<sup>f</sup> The Royal Prince Alfred Hospital, 2006 Sydney, Australia

<sup>g</sup> CHU de la Réunion, 97400 Saint-Pierre, France

<sup>h</sup> Department of endocrinology, metabolic diseases and nutrition, G. and R. Lemaire hospital, 44000 Nantes, France

<sup>i</sup> Programa de Biotecnología, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, 05600 México City, México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 March 2017

Received in revised form 30 March 2017

Accepted 13 April 2017

Available online xxx

## Keywords:

Apolipoprotein

Ceramide

Fenofibrate

Lipidomics

Type 2 diabetes

## ABSTRACT

**Aim.** – The benefit of the lipid-lowering drug fenofibrate on cardiovascular outcomes is controversial. Our aim was to find new circulating markers to identify those patients most likely to benefit from fenofibrate prescription.

**Methods.** – Analyses were conducted of plasma samples collected from 102 patients with type 2 diabetes, enrolled in the FIELD trial, before and after fenofibrate treatment (200 mg/day). Non-targeted and targeted lipid analyses and apolipoprotein measurements were made using mass spectrometry methods.

**Results.** – Lipidomics revealed a global decrease in ceramide after fenofibrate treatment: confirmed by quantitative analysis ( $-16.2\%$ ,  $P < 0.001$ ). These changes were strongly associated with those found for plasma sphingomyelin ( $r = 0.80$ ,  $P < 0.001$ ) and, to a lesser extent, for sphingosine-1-phosphate ( $r = 0.34$ ,  $P < 0.001$ ). Ceramide levels decreased in 73.5% of patients. In addition to the expected lipid changes (decreases in triglycerides, total cholesterol and LDL cholesterol, and increase in HDL cholesterol), fenofibrate also lowered plasma apoC-II ( $-13.1\%$ ,  $P < 0.01$ ), apoC-III ( $-24.6\%$ ;  $P < 0.001$ ), apoB100 ( $-27.0\%$ ,  $P < 0.01$ ) and sphingomyelinase ( $-7.6\%$ ,  $P < 0.001$ ), and increased plasma apoA-II (22.4%,  $P < 0.001$ ) as well as adiponectin (11.4%,  $P < 0.001$ ). No significant association was found between ceramide decrease and these modulations except for total cholesterol ( $r = 0.20$ ,  $P = 0.047$ ) and HDL protein components. At baseline, only elevated sphingolipid levels were significantly associated with ceramide reduction after fenofibrate treatment.

**Conclusion.** – Fenofibrate lowers plasma ceramide independently of the usual lipid parameters. As ceramide is a strong marker of atherosclerosis, our study underpins the need to further evaluate its contribution to cardiovascular events in fenofibrate-treated patients.

Crown Copyright © 2017 Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Abbreviations:** CVD, cardiovascular disease; LDL-C, LDL cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, HDL cholesterol; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; ESI, electrospray ionization; LC-HRMS, liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry; m/z, mass-to-charge ratio; RSD, relative standard deviation; S1P, sphingosine-1-phosphate; Cer, ceramide; SM, sphingomyelin; IS, internal standard; apo, apolipoprotein; TC, total cholesterol; S-ASM, secretory acid sphingomyelinase; PCA, principal component analysis; OPLS, orthogonal projections to latent structures.

\* Corresponding authors. INSERM UMR 1188, Plate-forme CYROI, 2, rue Maxime-Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, France. Fax: +262 262 938 801.

E-mail addresses: mikael.croyal@univ-nantes.fr (M. Croyal), gilles.lambert@univ-reunion.fr (G. Lambert).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the study.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2017.04.003>

1262-3636/Crown Copyright © 2017 Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Croyal M, et al. Fenofibrate decreases plasma ceramide in type 2 diabetes patients: A novel marker of CVD? Diabetes Metab (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2017.04.003>

## Introduction

The mortality caused by cardiovascular disease (CVD) is almost fourfold higher in diabetes patients and accounts for about 80% of diabetes-related death [1,2]. Patients with type 2 diabetes (T2D) usually present with atherogenic dyslipidaemia, characterized by elevated triglycerides (TG), mild elevation of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels [3].

Fibrates target this atherogenic dyslipidaemia as they increase HDL-C and decrease plasma TG and LDL-C concentrations [4] via activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), a major transcriptional regulator of lipoprotein metabolism [5,6]. Fenofibrate was one of the first marketed fibrates, and was tested in two large randomized cardiovascular outcome trials in diabetes patients. Unfortunately, both the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) and Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Lipid trials [7,8] failed to demonstrate significant benefits for cardiovascular events. However, significant beneficial effects were observed in a subset of patients with high TG and low HDL-C [9–12], suggesting that fenofibrate may be cardioprotective in some well-selected patients.

Thus, it was speculated that traditional as well as novel lipid markers might explain the heterogeneity in cardiovascular response observed with fenofibrate treatment. To unravel any potential new lipid markers of fenofibrate treatment in patients with T2D, non-targeted and targeted lipidomic approaches, using several powerful mass spectrometry-based methods [13–15], were performed to explore a broad range of biochemical parameters, including lipid species and apolipoproteins (apos) [16,17].

## Materials and methods

### Patients and study design

Plasma samples were collected from 102 T2D patients [males/females: 81/21; age:  $62.2 \pm 8.9$  years; body mass index (BMI):  $30.3 \pm 5.3$  kg/m<sup>2</sup>] enrolled at the Royal Prince Alfred Hospital (Sydney, Australia) in the FIELD study [18]. Briefly, plasma samples were collected after a 6-week placebo run-in (one capsule daily at breakfast; no lipid-lowering medication) and after a 6-week active-treatment period (200 mg/day co-micronized fenofibrate) [19], and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until needed for analysis.

### Non-targeted lipidomic analysis

All solvents were liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) grade, and were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands) unless otherwise specified. A non-targeted lipidomic analysis was first performed on a subset of paired samples (38 patients arbitrarily selected before and after treatment;  $n = 76$ ). Quality-control (QC) samples were used as previously indicated [20]. To constitute the QC samples, 10- $\mu\text{L}$  plasma samples ( $n = 76$ ) were collected from each patient and pooled before being split in 20 aliquots of 25  $\mu\text{L}$  each. Lipids were extracted from both the paired and QC plasma samples (25  $\mu\text{L}$ ) using 500  $\mu\text{L}$  of a methanol/chloroform mixture (2/1, v/v). Following centrifugation at  $20,000 \times g$  ( $10^\circ\text{C}$ ) for 10 min, the supernatants were collected and dried under nitrogen, then solubilized in 100  $\mu\text{L}$  of an isopropanol/acetonitrile/water mixture (2/1/1, v/v/v). Samples were then arbitrarily randomized before analysis [20] by liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (LC–HRMS), performed on a SYNAPT G2-Si High Definition MS Quantof mass spectrometer, equipped with an electrospray ionization (ESI) interface operating in the positive mode, and an ACQUITY UPLC H-Class System (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Samples and QC extracts were injected (10  $\mu\text{L}$ ) onto a reversed-phase LC column, and lipids were eluted as detailed in Table S1 (see supplementary material associated with this article online). The full HRMS mode was applied for lipid detection [mass-to-charge ratio (m/z) range 50–1200] at a mass resolution of 25,000 full-widths at half maximum. Ionization settings were: capillary voltage, +2 kV; cone voltage, 30 V; desolvation gas ( $\text{N}_2$ ) flow rate, 900 L/h; and desolvation gas/source temperatures, 550/120  $^\circ\text{C}$ . Leucine enkephalin solution (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50% acetonitrile) was infused at a constant flow rate of 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  through the LockSpray channel, allowing for correction of the measured m/z throughout the batch (theoretical m/z 556.2771 in positive mode).

Data acquisition and processing were achieved using MassLynx<sup>®</sup> and MakerLynx<sup>®</sup> version 4.1 software (Waters Corporation). Lipid markers were extracted from the detected variables using an in-house database containing reference lipid standards (exact mass measured  $\pm 5$  ppm, elemental compositions, retention times, fragmentation patterns) [21,22]. Simultaneously, QC sample analyses were performed to evaluate the analytical system's performance during the run. The relative standard deviation (RSD, %) was calculated for QC variable peak areas to evaluate their analytical quality and robustness. Finally, lipid markers in QC samples having an RSD value  $< 30\%$  were kept for the subsequent multivariate analyses [20].

### Quantification of sphingolipids in plasma

A pool of reference standard solutions, including sphingosine-1-phosphate (S1P; d18:1), nine ceramide (Cer) species and nine sphingomyelin (SM) species (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA; Table S2; see supplementary material associated with this article online), was prepared with serial dilutions of methanol to obtain seven standard solutions, ranging from 1–500 nmol/L, 2–1000 nmol/L and 0.04–20  $\mu\text{mol}/\text{L}$  for Cer, S1P and SM, respectively. Standard solutions and plasma samples (10  $\mu\text{L}$ ) were then extracted with 500  $\mu\text{L}$  of methanol/chloroform mixture (2/1, v/v) containing exogenous internal standards [IS; Cer (d18:1/17:0) 500 nmol/L; S1P (d17:1) 500 nmol/L; and SM (d18:1/17:0) 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ]. Samples were mixed and centrifuged for 10 min at  $20,000 \times g$  ( $10^\circ\text{C}$ ), and the supernatants dried under a nitrogen stream and solubilized in 100  $\mu\text{L}$  of methanol for liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) analyses, performed on a Xevo TQD mass spectrometer with an ESI interface and ACQUITY H-Class UPLC System (Waters Corporation). Data acquisition and analyses were performed with MassLynx<sup>®</sup> and TargetLynx<sup>®</sup> version 4.1 software, respectively (Waters Corporation).

Samples (10  $\mu\text{L}$ ) were injected onto a reversed-phase LC column and the compounds separated (Table S1). Sphingolipids were detected by MS with the ESI interface operating in positive ion mode (capillary voltage, +3 kV; desolvation gas [ $\text{N}_2$ ] flow and temperature, 1000 L/h and 400  $^\circ\text{C}$ ; source temperature, 150  $^\circ\text{C}$ ). The multiple reaction-monitoring (MRM) mode was applied (Table S2). Linearity was expressed by the mean  $r^2$  and was  $> 0.998$  for all compounds (linear regression, 1/x weighting, origin excluded). Intra- and interassay imprecisions of the analytical method were assessed over four distinct experiments (six replicates for four spiked concentrations), and the RSDs were  $< 13\%$ ,  $< 6\%$  and  $< 9\%$  for Cer, SM and S1P, respectively. Recoveries were assessed with IS and were  $> 91\%$ .

### Apolipoprotein quantification

Apolipoproteins (A-I, A-II, B100, C-I, C-II, C-III, E and M) were quantified in plasma samples (30  $\mu\text{L}$ ), using a validated multiplexed assay involving trypsin proteolysis and subsequent analysis

of proteotypic peptides by LC–MS/MS [16,17]. ProteinWorks eXpress Digest Kits (Waters Corporation) were used according to supplier's instructions for sample preparation. Unlabelled and labelled synthetic peptide biopolymers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used for standard solutions and IS, respectively. After digestion, samples were cleaned using 1-cc Oasis HLB 30-mg cartridges (Waters Corporation), which had been conditioned, equilibrated, loaded, washed and eluted with methanol (1 mL), water (1 mL), samples (~200 µL), 5% methanol (1 mL) and 80% methanol (500 µL), respectively. Eluates were dried under nitrogen and reconstituted with 100 µL of 5% acetonitrile, and 10-µL quantities were injected into the LC–MS/MS system, as described previously [16] (Tables S1 and S3; see supplementary material associated with this article online). Linearity was expressed by the mean  $r^2$ , which was > 0.995 for all compounds (linear regression, 1/x weighting, origin excluded). Intra- and interassay imprecisions were assessed over four distinct experiments (three replicates for 60 plasma samples), and the RSDs were < 9% and < 1.2% for all apolipoproteins, respectively.

#### Other biochemical measurements

Total cholesterol (TC), TG, HDL-C and LDL-C concentrations were obtained as described previously [18], and non-HDL-C concentrations were calculated. Secretory acid sphingomyelinase (S-ASM) and adiponectin concentrations were measured in plasma samples using two commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to manufacturer's instructions (Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA and Adipogen Corporation, San Diego, CA, USA). HDL-C particle diameters were estimated using the updated Shen model [23]: HDL diameter (nm) =  $4.66 + 12.31 \times [\text{HDL-C}/(\text{apoA-I} + \text{apoA-II})]$ , with HDL-C, apoA-I and apoA-II in mg/dL.

#### Statistical analyses

To achieve comprehensive comparisons of our sample profiles from patients before and after treatment, unsupervised principal component analysis (PCA) and supervised orthogonal projection to latent structures (OPLS) models were applied using their dedicated software (SIMCA-P+, Umetrics, Umeå, Sweden). The PCA model provides a general overview of the main discriminations observed, whereas the OPLS model targets supervised discrimination through integration of a variable Y indicating the 'treatment' status of patients. Corresponding OPLS model volcano plots allow visualization of the most discriminating normalized variables between pretreated and post-treated patient samples. Model validity was assessed using permutation tests and analysis of variance of cross-validated residuals (CV-ANOVA). Univariate statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Results were compared using paired t tests and parametric Pearson correlations. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) and considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

#### Selection of lipid markers with fenofibrate treatment

From the non-targeted analysis, data processing allowed the detection of 1437 variables, each characterized by a specific m/z ratio and retention time. All variables related to an overlapping isotopic signal were excluded, and variables corresponding to a single marker detected in several adducts were added. A total of 153 variables thus presented a possible match with our lipid database, based on accurate mass ( $\pm 5$  ppm) and retention time ( $\pm 30$  s) (Table S4; see supplementary material associated with this

article online). Of these 153 lipids, 119 exhibiting an RSD value < 30% (range: 0.2–27.4%) in QC samples ( $n = 20$ ) were selected for multivariate analysis. As shown in Fig. 1A, the non-supervised PCA model displayed a clear discrimination between the pre- and post-treatment groups. The supervised OPLS model was subsequently performed [ $R^2(X) = 0.369$ ,  $R^2(Y) = 0.979$ ,  $Q^2 = 0.954$ , CV-ANOVA:  $P < 0.0001$ ], and relevant markers related to fenofibrate treatment were selected from the OPLS-associated volcano plots. As shown in Fig. 1B, several markers were significantly regulated by fenofibrate treatment. The main result (Fig. 1B) was a global decrease in all variables corresponding to Cer species (14 compounds, including isomers, shown in red) after fenofibrate treatment. Five Cer species were significantly downregulated ( $P < 0.001$ ) on multivariate analysis.

#### Fenofibrate reduced plasma ceramide concentrations

As detailed in Table 1, both Cer and SM species were quantified in the entire set of paired plasma samples (102 patients before and after treatment). Seven Cer species were detected in plasma and were significantly decreased (by –11.4% up to –20.2%;  $P < 0.05$ ) with fenofibrate treatment. Compared with a placebo, fenofibrate reduced total plasma Cer levels by 18.2% ( $P < 0.001$ ). Cer reduction was observed for 73.5% of patients ( $n = 75$ ; Fig. S1, see supplementary material associated with this article online). Although four of the nine SM species detected in plasma were significantly altered (either increased or decreased), fenofibrate did not significantly affect either total plasma SM levels ( $P = 0.366$ ) or modulate plasma S1P concentrations ( $1.07 \pm 0.34$  µmol/L vs  $1.04 \pm 0.33$  µmol/L for placebo, respectively;  $P = 0.377$ ).

#### Ceramide lowering was not related to S-ASM

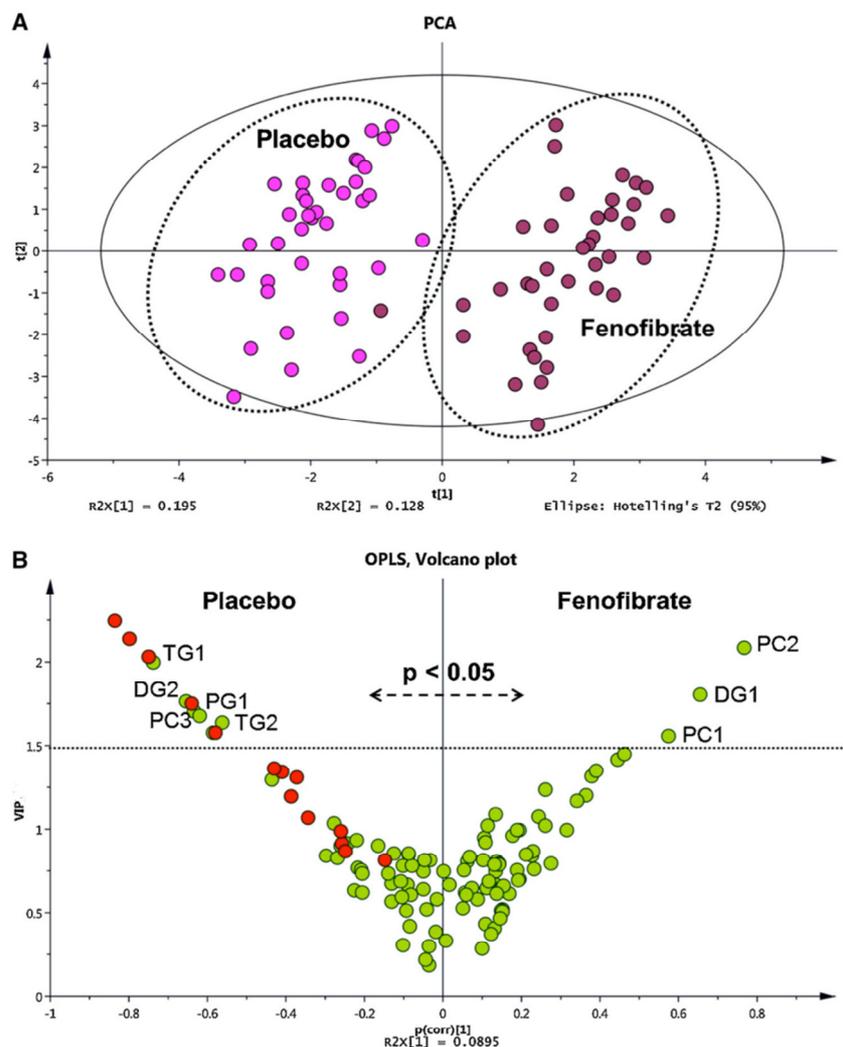
Compared with the placebo (Fig. 2A), fenofibrate significantly reduced product-to-substrate ratios (Cer/SM) of S-ASM by 23.6% ( $P < 0.001$ ). Also, changes in plasma Cer and SM levels were strongly correlated (Fig. 2B,  $r = 0.800$ ,  $P < 0.001$ ), suggesting that both lipid families were similarly impacted by fenofibrate treatment. As shown in Fig. 2C, fenofibrate slightly but significantly reduced S-ASM plasma concentrations by 7.6% ( $131.2 \pm 32.0$  ng/mL vs  $121.2 \pm 27.8$  ng/mL;  $P < 0.001$ ), although these changes were not significantly associated with Cer/SM ratios ( $r = -0.146$ ,  $P = 0.124$ ; Fig. 2D).

#### Effect of fenofibrate on other plasma lipids and apolipoproteins

As previously reported (Table 2), fenofibrate decreased TC by 11.3% ( $P < 0.001$ ), LDL-C by 12.8% ( $P < 0.001$ ), non-HDL-C by 12.9% ( $P < 0.001$ ) and TG by 30.7% ( $P < 0.001$ ), while HDL-C was increased by 5.7% ( $P < 0.01$ ). In addition, fenofibrate increased plasma adiponectin by 11.4% ( $P < 0.001$ ), apoA-II by 22.4% ( $P < 0.001$ ) and apoM by 7.8% ( $P = 0.016$ ), but decreased plasma apoB100 by 27.0% ( $P < 0.001$ ), apoC-I by 12.9% ( $P = 0.050$ ), apoC-II by 11.1% ( $P = 0.005$ ) and apoC-III by 24.6% ( $P < 0.001$ ). However, no significant changes were observed for plasma apoE (–7.9%;  $P = 0.058$ ) and apoA-I (6.1%;  $P = 0.104$ ). As expected, several associations were observed between plasma lipids and apolipoproteins (Table S5, see supplementary material associated with this article online). Of note, fenofibrate treatment did not significantly affect the size of HDL particles ( $8.3 \pm 0.9$  nm vs  $8.3 \pm 1.0$  nm with placebo;  $P = 0.970$ ).

#### Ceramide associations with plasma lipids and apolipoproteins

After fenofibrate treatment, the decrease in plasma Cer levels was significantly associated with changes in TC ( $r = 0.203$ ,  $P = 0.047$ ), S1P ( $r = 0.34$ ,  $P < 0.001$ ), apoA-I ( $r = 0.26$ ,  $P = 0.011$ ),



**Fig. 1.** Lipidomics reveals ceramide species to be new potential lipid markers of fenofibrate efficacy: the principal component analysis (PCA) model is based on identified lipids ( $n = 119$ ) from the lipid profiles of human plasma samples (placebo vs. fenofibrate,  $n = 38$  per group) (A); the corresponding volcano plot of the orthogonal projection to latent structures (OPLS) model highlights the main lipid class differences associated with fenofibrate treatment—namely, ceramide species (red dots) and additional significant lipids (labelled) (B). PC: phosphatidylcholine; PG: phosphatidylglycerol; TG: triglyceride; DG: diglyceride; VIP: variable importance of projection.

**Table 1**  
Ceramide and sphingomyelin concentrations (means  $\pm$  SD) as measured in plasma.

Fatty acyl	Plasma ceramide (nmol/L)			Plasma sphingomyelin ( $\mu$ mol/L)		
	Placebo	Fenofibrate	Fold change	Placebo	Fenofibrate	Fold change (%)
C16:0	0.11 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.04	−19.4%***	96.5 $\pm$ 21.5	98.4 $\pm$ 23.0	+2.0
C18:0	0.14 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.05	−19.7%***	13.0 $\pm$ 3.5	12.1 $\pm$ 3.2	−7.5**
C18:1	BLOD	BLOD	NA	7.1 $\pm$ 1.9	7.0 $\pm$ 2.1	−2.0
C20:0	0.10 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.04	−15.0%**	75.4 $\pm$ 20.8	70.9 $\pm$ 20.1	−6.0*
C20:1	BLOD	BLOD	NA	3.0 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.7	−3.6
C22:0	2.46 $\pm$ 1.19	2.02 $\pm$ 0.82	−17.7%***	64.5 $\pm$ 18.4	67.5 $\pm$ 20.6	+4.6
C22:1	0.03 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01	−11.4%**	24.1 $\pm$ 6.2	23.6 $\pm$ 6.9	−1.9
C24:0	0.47 $\pm$ 0.21	0.41 $\pm$ 0.16	−14.0%***	45.0 $\pm$ 16.0	50.4 $\pm$ 19.7	+12.1**
C24:1	1.73 $\pm$ 0.78	1.279 $\pm$ 537.6	−20.2%***	73.1 $\pm$ 19.5	78.7 $\pm$ 23.0	+7.8*
Total	5.05 $\pm$ 2.20	4.13 $\pm$ 1.50	−18.2%***	401.7 $\pm$ 95.5	411.5 $\pm$ 107.7	+2.4

BLOD: below limit of detection; NA: not applicable.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$  (by paired t-test for group comparisons).

Please cite this article in press as: Croyal M, et al. Fenofibrate decreases plasma ceramide in type 2 diabetes patients: A novel marker of CVD? Diabetes Metab (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2017.04.003>

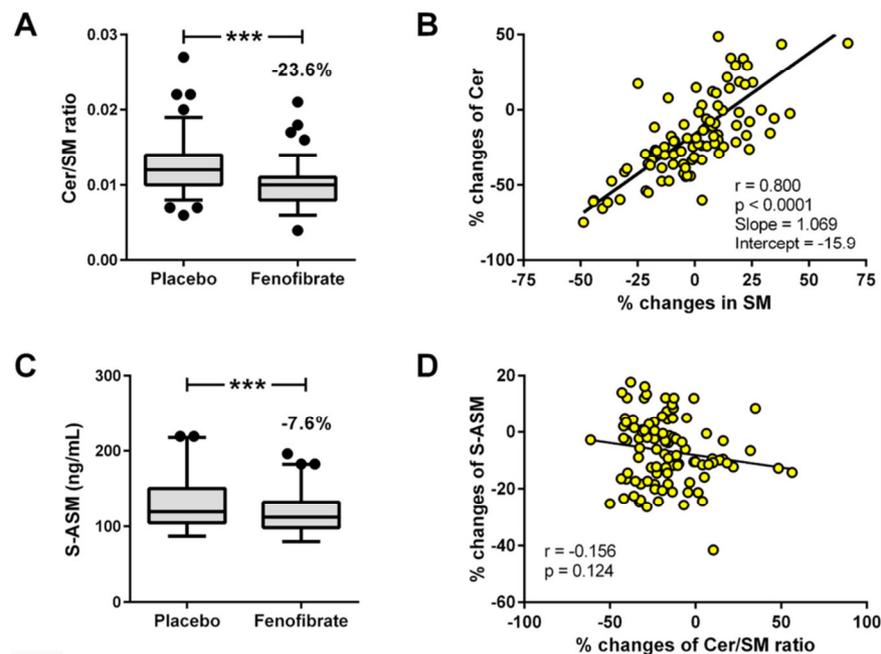


Fig. 2. Associations between ceramide (Cer) and sphingomyelin (SM) in the circulation: changes in Cer/SM ratio after fenofibrate treatment (A); Pearson correlation of changes in plasma Cer and SM after fenofibrate treatment (B); effect of fenofibrate on secretory acid sphingomyelinase (S-ASM) concentrations (C); and Pearson correlation of changes in Cer/SM ratio and S-ASM concentrations after fenofibrate treatment (D). \*\*\*  $P < 0.001$ .

Table 2  
Plasma lipids before and after fenofibrate treatment (means  $\pm$  SD).

Parameters	Placebo	Fenofibrate	Fold change (%)
TC (mmol/L)	5.0 $\pm$ 0.8	4.5 $\pm$ 0.7	-11.3***
HDL-C (mmol/L)	1.1 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.3	+5.7**
LDL-C (mmol/L)	3.0 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.6	-12.8***
Non-HDL-C (mmol/L)	3.7 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 0.7	-12.9***
TG (mmol/L)	2.0 $\pm$ 1.3	1.4 $\pm$ 0.6	-30.7***
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	10.5 $\pm$ 4.0	11.7 $\pm$ 4.3	+11.4**
ApoA-I (mg/dL)	123.2 $\pm$ 29.9	129.3 $\pm$ 32.0	+4.9
ApoA-II (mg/dL)	29.7 $\pm$ 10.1	36.4 $\pm$ 12.1	+22.4***
ApoB100 (mg/dL)	90.9 $\pm$ 55.6	66.3 $\pm$ 45.0	-27.0***
ApoC-I (mg/dL)	0.6 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3	-12.9**
ApoC-II (mg/dL)	2.3 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.9	-11.1**
ApoC-III (mg/dL)	18.3 $\pm$ 11.8	13.8 $\pm$ 7.9	-24.6***
ApoE (mg/dL)	5.0 $\pm$ 2.0	4.6 $\pm$ 1.5	-7.9
ApoM (mg/dL)	2.1 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 0.5	+7.8*

TC: total cholesterol; HDL-C/LDL-C: high-density/low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglyceride; Apo: apolipoprotein.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$  (by paired *t*-test for group comparisons).

apoA-II ( $r = 0.21$ ,  $P = 0.045$ ) and apoM ( $r = 0.24$ ,  $P = 0.018$ ), whereas no association was found between plasma S-ASM changes, or any lipid species or HDL particle size. In addition, no correlation was found between plasma Cer and non-HDL-C, plasma TG and plasma apoB100. Similar changes in Cer were found when patients were stratified by elevated levels of non-HDL-C ( $> 3.36$  mmol/L) and TG ( $> 2.33$  mmol/L), or low levels of HDL-C ( $< 0.88$  mmol/L) and LDL-C ( $< 2.59$  mmol/L), as described in studies showing significant beneficial effects in these subgroups [9–12]. Significant inverse correlations were also found between decreases of Cer and baseline concentrations of plasma Cer ( $r = -0.52$ ,  $P < 0.001$ ), SM ( $r = -0.37$ ,  $P < 0.001$ ), S1P ( $r = -0.27$ ,  $P = 0.01$ ) and S-ASM ( $r = -0.22$ ,  $P = 0.034$ ), whereas no association was found between

reductions of plasma Cer and basal levels of apolipoproteins, adiponectin or other plasma lipids (Fig. 3). It is noteworthy, however, that in the subset of patients whose Cer levels were reduced by fenofibrate ( $n = 75$ ), a significant correlation between Cer modulation and baseline levels of TG ( $r = -0.34$ ,  $P = 0.004$ ) was found. However, no association was observed between Cer and TG modulations in a subset of patients ( $n = 50$ ) with elevated TG levels ( $> 1.7$  mmol/L or 150 mg/dL) at baseline.

## Discussion

Our present study investigated changes in the lipidomic profiles of T2D patients treated with fenofibrate. The non-targeted lipidomic approach revealed a global decrease in plasma Cer that was subsequently confirmed by precise quantitative assays. Fenofibrate also increased plasma apolipoproteins related to HDL metabolism, while decreasing those related to TG-rich lipoprotein metabolism.

Sphingolipids, and especially Cer, appear to be important bioactive lipids involved in T2D [24,25] and atherosclerosis [26,27]. Recently, Cer was independently associated with fatal outcomes in coronary artery disease, and its predictive value was superior to that of LDL-C [28]. Cer also plays a central role in sphingolipid metabolism, and its synthesis requires activation of serine palmitoyltransferase (SPT) [29]. After synthesis in the liver, Cer can be either converted to SM or catabolized to sphingosine and then S1P. Following hepatic synthesis, SM is incorporated into very-low-density lipoprotein (VLDL) for secretion into the circulation, where ASM can convert it back to Cer. The availability of SM for transport on lipoproteins depends on SPT. Alternatively, adiponectin can stimulate ceramidase activity in the liver, thereby enhancing the conversion of Cer into S1P independently of other effects on lipid metabolism [30]. Thus, the Cer reduction measured after fenofibrate treatment might be related to either a direct

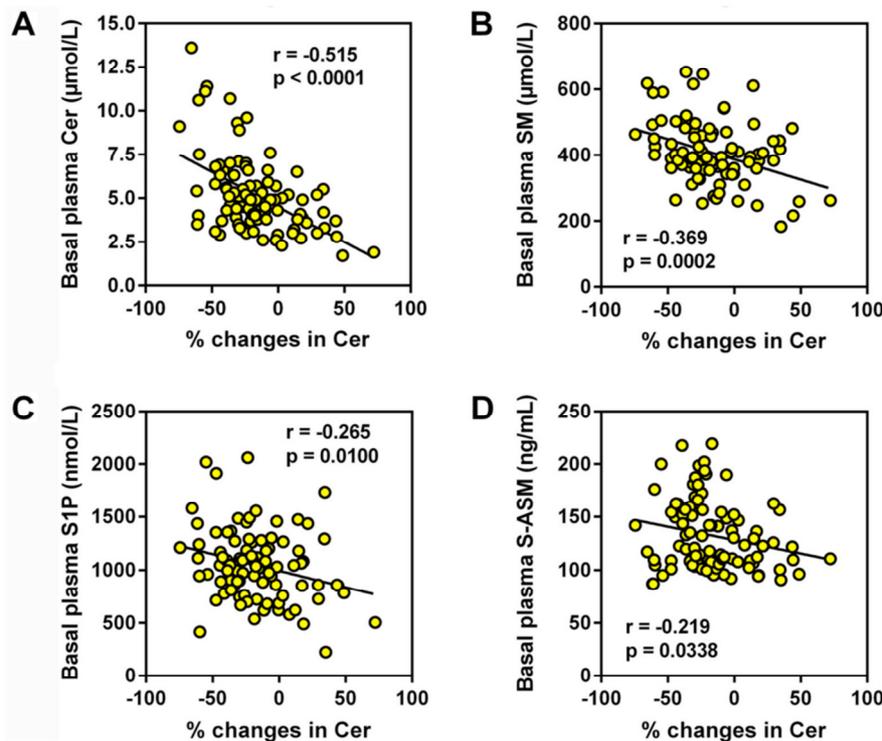


Fig. 3. Pearson correlations between changes in plasma ceramide (Cer) after treatment and basal plasma Cer (A), basal plasma sphingomyelin (SM) (B), basal plasma sphingosine-1-phosphate (S1P) (C), and basal plasma secretory acid sphingomyelinase (S-ASM) concentrations (D).

impact on hepatic (SPT, ceramidase) or circulating (ASM) synthesis, or an indirect impact related to a carrier effect (VLDL) due to changes in circulating lipoprotein levels.

In our present study, fenofibrate reduced plasma S-ASM and its related product-to-substrate ratio (Cer/SM). However, these changes were not correlated, and S-ASM changes did not appear to be the major factor behind the decrease of plasma Cer synthesis in the circulation. In fact, plasma Cer reductions were only associated with elevated baseline levels of plasma Cer, SM and S1P. SPT is strongly increased in hypertriglyceridaemia [31], and a significant association was demonstrated between Cer modulation and elevated baseline levels of TG in the subset of patients whose Cer levels were reduced by fenofibrate. Therefore, it might be speculated that fenofibrate could act on the SPT reaction, a rate-limiting step in de novo synthesis of Cer [29], although this is unlikely as changes in Cer did not significantly correlate with changes in TG levels in these patients. It is also noteworthy that no correlation was observed with adiponectin increases, known to be an independent stimulator of ceramidase leading to conversion of Cer into S1P [30].

Fenofibrate is a PPAR $\alpha$  agonist that acts on lipoprotein metabolism [5,6]. Thus, the reduction of plasma Cer observed in our study might be the result of changes in lipoprotein secretion and/or catabolism. The variations measured in apolipoprotein plasma concentrations could support this hypothesis, but no correlation was found between plasma Cer and apolipoprotein variations except for HDL components. In this context, rosuvastatin has also reduced Cer concentrations with parallel reductions in VLDL levels [32]. This suggests that Cer modulations could be related to enhanced VLDL catabolism, an effect most likely mediated by reductions in apoC-III [33] and/or increases in

adiponectin [34]. It is known that fenofibrate reduces VLDL levels by accelerating their catabolism [35–37]. In our study, fenofibrate significantly increased adiponectin and reduced apoC-III, although no correlation could be found between changes in both apoC-III and adiponectin and changes in Cer, thus making it unlikely that fenofibrate-mediated Cer reductions are the result of lower levels of VLDL.

Our present study has some limitations. The non-targeted lipidomic approach was restricted to the known lipid compounds in our database, so potentially ignoring some interesting but uncharacterized compounds. This suggests that accurate analysis of a more complete set of variables should provide additional insights into the efficacy of fenofibrate. It should also be emphasized that the number of patients was small, rendering any evaluation of Cer decreases on cardiovascular events not feasible.

## Conclusion

In summary, our study has shown that fenofibrate reduces plasma Cer in T2D patients, especially those presenting with high baseline Cer levels. However, this modulation did not appear to be related to lipoprotein profiles, not even when patients were stratified by baseline lipid levels. Our study therefore indicates that Cer might be an independent marker of CVD in T2D patients, as previously suggested for non-diabetics [28,38,39]. As Cer appears to be involved in both T2D and atherosclerosis [24,26,27], our findings underscore the need to evaluate its predictive value regarding the onset of cardiovascular events in such patients.

**Ethical statement**

The study was approved by the Royal Prince Alfred Hospital ethics committee, and all patients gave their written informed consent to participate.

**Disclosure of interest**

The authors declare that they have no competing interest.

**Acknowledgments**

We are grateful to the Biogenouest CORSAIRE core facility for its financial support. G.L. is a recipient of an Allocation de recherche chaire mixte (INSERM–Université de La Réunion), and a Programme de recherche hospitalière en santé (ANR-16-RHUS-0007).

**Appendix A. Supplementary data**

Supplementary materials (Tables S1–S5 and Fig. S1) associated with this article can be found at <http://www.sciencedirect.com> at <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2017.04.003>.

**References**

- [1] Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 1985;110:1100–7.
- [2] Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16:434–44.
- [3] Shipman KE, Strange RC, Ramachandran S. Use of fibrates in the metabolic syndrome: a review. *World J Diabetes* 2016;7:74–88.
- [4] Farnier M. Update on the clinical utility of fenofibrate in mixed dyslipidemias: mechanisms of action and rational prescribing. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4:991–1000.
- [5] Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res* 2008;2008:132960.
- [6] Feng X, Gao X, Jia Y, Zhang H, Pan Q, Yao Z, et al. PPAR- $\alpha$  agonist fenofibrate decreased serum irisin levels in type 2 diabetes patients with hypertriglyceridemia. *PPAR Res* 2015;2015:924131.
- [7] Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1849–61.
- [8] Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse 3rd JR, Leiter LA, Linz P, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2010;362:1563–74.
- [9] Jun M, Foote C, Lv J, Neal B, Patel A, Nicholls SJ, et al. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010;375:1875–84.
- [10] Burgess DC, Hunt D, Li L, Zannino D, Williamson E, Davis TM, et al. Incidence and predictors of silent myocardial infarction in type 2 diabetes and the effect of fenofibrate: an analysis from the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study. *Eur Heart J* 2010;31:92–9.
- [11] Bruckert E, Labreuche J, Deplanque D, Touboul PJ, Amarencu P. Fibrates effect on cardiovascular risk is greater in patients with high triglyceride levels or atherogenic dyslipidemia profile: a systematic review and meta-analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;57:267–72.
- [12] Elam MB, Ginsberg HN, Lovato LC, Corson M, Largay J, Leiter LA, et al. Association of fenofibrate therapy with long-term cardiovascular risk in statin-treated patients with type 2 diabetes. *JAMA Cardiol* 2016;2:370–80. <http://dx.doi.org/10.1001/jamacardio.2016.4828>.
- [13] Lam SM, Shui G. Lipidomics as a principal tool for advancing research. *J Genet Genomics* 2013;40:375–90.
- [14] Han X. Lipidomics for studying metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12:668–79.
- [15] Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res* 2010;51:3299–305.
- [16] Croyal M, Fall F, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Zair Y, Ouguerram K, et al. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J Lipid Res* 2016;57:509–15.
- [17] Tavori H, Christian D, Minnier J, Plubell D, Shapiro MD, Yeang C, et al. PCSK9 association with lipoprotein(a). *Circ Res* 2016;119:29–35.
- [18] Lambert G, Ancellin N, Charlton F, Comas D, Pilot J, Keech A, et al. Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin Chem* 2008;54:1038–45.
- [19] Scott R, Best J, Forder P, Taskinen MR, Simes J, Barter P, et al. Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study: baseline characteristics and short-term effects of fenofibrate [ISRCTN64783481]. *Cardiovasc Diabetol* 2005;4:13.
- [20] Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* 2011;6:1060–83.
- [21] Gallart-Ayala H, Courant F, Severe S, Antignac JP, Morio F, Abadie J, et al. Versatile lipid profiling by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry using all ion fragmentation and polarity switching. Preliminary application for serum samples phenotyping related to canine mammary cancer. *Anal Chim Acta* 2013;796:75–83.
- [22] Sandra K, Pereira Ados S, Vanhoenacker G, David F, Sandra P. Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2010;1217:4087–99.
- [23] Mazer NA, Giulianini F, Paynter NP, Jordan P, Mora S. A comparison of the theoretical relationship between HDL size and the ratio of HDL cholesterol to apolipoprotein A-I with experimental results from the women's health study. *Clin Chem* 2013;59:949–58.
- [24] Boon J, Hoy AJ, Stark R, Brown RD, Meex RC, Henstridge DC, et al. Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* 2013;62:401–10.
- [25] Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, Defronzo RA, et al. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* 2009;58:337–43.
- [26] Cheng JM, Suoniemi M, Kardys I, Vihervaara T, de Boer SP, Akkerhuis KM, et al. Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: results of the ATHERO-REMO-IVUS study. *Atherosclerosis* 2015;243:560–6.
- [27] Bismuth J, Lin P, Yao Q, Chen C. Ceramide: a common pathway for atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2008;196:497–504.
- [28] Tarasov K, Ekroos K, Suoniemi M, Kauhanen D, Sylvänne T, Hurme R, et al. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E45–52.
- [29] Deevska GM, Sunkara M, Morris AJ, Nikolova-Karakashian MN. Characterization of secretory sphingomyelinase activity, lipoprotein sphingolipid content and LDL aggregation in *ldlr*<sup>-/-</sup> mice fed on a high-fat diet. *Biosci Rep* 2012;32:479–90.
- [30] Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 2011;17:55–63.
- [31] Torre-Villalvazo I, Gonzalez F, Aguilar-Salinas CA, Tovar AR, Torres N. Dietary soy protein reduces cardiac lipid accumulation and the ceramide concentration in high-fat diet-fed rats and ob/ob mice. *J Nutr* 2009;139:2237–43.
- [32] Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Meikle PJ, Barrett PH. Association of plasma ceramides and sphingomyelin with VLDL apoB-100 fractional catabolic rate before and after rosuvastatin treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:2497–501.
- [33] Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Chen MM, Nestel PJ, Sviridov D, et al. Dose-dependent effect of rosuvastatin on VLDL-apolipoprotein C-III kinetics in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2008;31:1656–61.
- [34] Ng TW, Watts GF, Farvid MS, Chan DC, Barrett PH. Adipocytokines and VLDL metabolism: independent regulatory effects of adiponectin, insulin resistance, and fat compartments on VLDL apolipoprotein B-100 kinetics? *Diabetes* 2005;54:795–802.
- [35] Watts GF, Barrett PH, Ji J, Serone AP, Chan DC, Croft KD, et al. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes* 2003;52:803–11.
- [36] Vergès B, Florentin E, Baillot-Rudoni S, Monier S, Petit JM, Rageot D, et al. Effects of 20 mg rosuvastatin on VLDL1-, VLDL2-, IDL- and LDL-ApoB kinetics in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2008;51:1382–90.
- [37] Ouguerram K, Magot T, Zair Y, Marchini JS, Charbonnel B, Laouenan H, et al. Effect of atorvastatin on apolipoprotein B100 containing lipoprotein metabolism in type-2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:332–7.
- [38] Siguener A, Kleber ME, Heimerl S, Liebis G, Schmitz G, Maerz W. Glycero-phospholipid and sphingolipid species and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *PLoS One* 2014;9:e85724.
- [39] Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, Hilvo M, Vihervaara T, Kauhanen D, et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J* 2016;37:1967–76.

## APPENDIX A

Supplemental Table 1. Details of the elution methods.

Methods	Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)	
<b>Non-targeted lipidomic<sup>1</sup></b>	0.0	60	40	
	2.0	57	43	
	2.1	50	50	
	Acquity <sup>®</sup> CSH C <sub>18</sub> column 2.1 × 100 mm, 1.7 μm 400 μL/min 55 °C	12.0	46	54
	12.1	30	70	
	18.1	1	99	
	20.0	1	99	
	22.0	60	40	
<b>Targeted analysis of sphingolipids<sup>2</sup></b>	0.0	60	40	
	Acquity <sup>®</sup> BEH C <sub>18</sub> column 2.1 × 50 mm, 1.7 μm 400 μL/min 60 °C	4.0	1	99
	5.5	1	99	
	6.0	60	40	
	8.0	60	40	
<b>Targeted analysis of apolipoproteins<sup>3</sup></b>	0.0	99	1	
	Acquity <sup>®</sup> BEH C <sub>18</sub> column 2.1 × 100 mm, 1.7 μm 600 μL/min 60 °C	5.0	50	50
	6.0	50	50	
	7.0	99	1	
	8.0	99	1	

1. Mobile phase A: 60/40 (acetonitrile/water, v/v) + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium acetate – Mobile phase B: 90/10 (isopropanol/acetonitrile, v/v) + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium acetate.

2. Mobile phase A: 5/95 (acetonitrile/water, v/v) + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate – Mobile phase B: 50/50 (isopropanol/acetonitrile, v/v) + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate.

3. Mobile phase A: 5/95 (acetonitrile/water, v/v) + 0.1% formic acid – Mobile phase B: 100% acetonitrile + 0.1% formic acid.

## APPENDIX B

**Supplemental Table 2** - Analytical parameters selected for the quantification of sphingolipids.

Name	Cone/collision (V)	MRM transition ( <i>m/z</i> )
S1P d18:1	28/14	380.2 → 264.3
S1P d17:1, IS	28/14	366.2 → 250.3
Cer (d18:1/16:0)	28/26	538.5 → 264.3
Cer (d18:1/18:1)	28/24	564.5 → 264.3
Cer (d18:1/18:0)	30/26	566.5 → 264.3
Cer (d18:1/20:1)	28/26	592.3 → 264.3
Cer (d18:1/20:0)	28/26	594.3 → 264.3
Cer (d18:1/22:1)	30/30	620.6 → 264.3
Cer (d18:1/22:0)	30/30	622.6 → 264.3
Cer (d18:1/24:1)	28/30	648.6 → 264.3
Cer (d18:1/24:0)	34/26	650.6 → 264.3
Cer (d18:1/17:0), IS	28/28	552.5 → 264.3
SM (d18:1/16:0)	58/26	703.6 → 184.1
SM (d18:1/18:1)	32/40	729.6 → 184.1
SM (d18:1/18:0)	58/32	731.5 → 184.1
SM (d18:1/20:1)	38/30	757.4 → 184.1
SM (d18:1/20:0)	46/26	759.7 → 184.1
SM (d18:1/22:1)	38/30	785.7 → 184.1
SM (d18:1/22:0)	40/30	787.7 → 184.1
SM (d18:1/24:1)	38/30	813.7 → 184.1
SM (d18:1/24:0)	36/30	815.7 → 184.1
SM (d18:1/17:0), IS	56/30	717.6 → 184.1

MRM, multiple reaction monitoring; S1P, sphingosine-1-phosphate; Cer, ceramide; SM, sphingomyelin; IS, internal standard.

## APPENDIX C

Supplemental Table 3 - Mass spectrometry parameters used for peptide detection.

Apolipoprotein (MW)		Proteotypic peptide	Fragment	Cone/collision	MRM transition ( <i>m/z</i> )	Range
ApoA-I (28,079 Da)	Peptide	ATEHLSTLSEK	$y_{10}^{2+}$	25/15 V	406.2 → 573.2	0.5-50 µmol/L
	IS	ATEHLSTLSE <b>K</b>			408.9 → 577.2	10 µmol/L
ApoA-II (17,416 Da)	Peptide	SPELQAEAK	$y_6^+$	30/30 V	486.8 → 659.3	0.5-50 µmol/L
	IS	SPELQAE <b>A</b> K			490.3 → 667.3	10 µmol/L
ApoB100 (512,858 Da)	Peptide	NLQNNAEWVYQGAIR	$y_6^+$	30/17 V	593.1 → 707.6	0.25-25 µmol/L
	IS	NLQNNAEWVYQGA <b>R</b>			596.4 → 717.6	1 µmol/L
ApoC-I (6,627 Da)	Peptide	TPDVSSALDK	$y_9^{2+}$	40/23 V	517.4 → 466.8	0.05-5 µmol/L
	IS	TPDVSSAL <b>D</b> K			521.4 → 470.8	1 µmol/L
ApoC-II (8,204 Da)	Peptide	TAAQNLYEK	$y_7^+$	35/20 V	519.7 → 865.7	0.25-25 µmol/L
	IS	TAAQN <b>L</b> YEK			523.7 → 873.7	1 µmol/L
ApoC-III (8,765 Da)	Peptide	DALSSVQESQVAQQAR	$y_8^+$	40/35 V	858.9 → 887.5	0.25-25 µmol/L
	IS	DALSSVQESQVA <b>Q</b> QAR			863.4 → 897.5	1 µmol/L
ApoE (34,237 Da)	Peptide	LGPLVEQGR	$y_5^+$	25/30 V	484.8 → 588.3	0.1-10 µmol/L
	IS	LGPLVE <b>Q</b> GR			489.3 → 598.3	1 µmol/L
ApoM (21,253 Da)	Peptide	AFLLT <b>P</b> R	$y_5^+$	30/10 V	409.3 → 599.5	0.1-10 µmol/L
	IS	AFLLT <b>P</b> R			414.3 → 609.5	1 µmol/L

MRM, multiple reaction monitoring; MW, molecular weights. Bold indicates the labeled amino acid [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ ]-K or [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ ]-R of internal standards (IS).

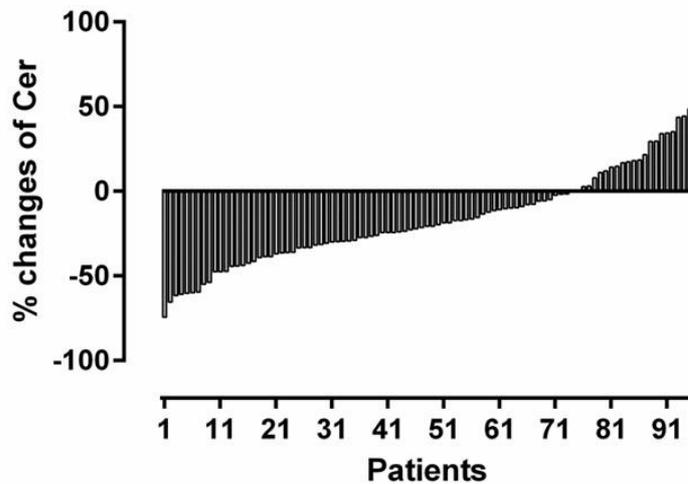
## APPENDIX D

**Supplemental Table 4** - Details of lipids identified in plasma samples using the in-house database (positive ionization mode).

Classification	Number of lipids	Major adduct	RT range (min)
<b>Glycerolipids</b>			
TG	19	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> , [M+Na] <sup>+</sup>	16.02-16.68
DG	5	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> , [M+Na] <sup>+</sup>	11.04-14.04
<b>Glycerophospholipids</b>			
LPE	5	[M+H] <sup>+</sup>	1.18-2.11
PE	16	[M+H] <sup>+</sup>	8.31-13.50
LPC	9	[M+H] <sup>+</sup>	0.95-1.98
PC	37	[M+H] <sup>+</sup>	4.15-13.63
PI	4	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	5.26-6.83
PS	5	[M+H] <sup>+</sup>	4.01-5.76
<b>Sphingolipids</b>			
SM	16	[M+H] <sup>+</sup>	5.44-14.82
Cer	14	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> / [M+H] <sup>+</sup>	9.71-15.04
<b>Sterol lipids</b>			
CE	19	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> , [M+Na] <sup>+</sup>	13.46-17.12
Sterols	4	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	6.68-8.30
<b>TOTAL</b>	<b>153</b>		

RT, retention time; TG, triglyceride; DG, diacylglyceride; LPE, lysophosphatidylethanolamine; PE, glycerophosphoethanolamine; LPC, lysophosphatidylcholine; PC, glycerophosphocholine; PI, glycerophosphoinositol; PS, glycerophosphoserine; SM, sphingomyelin; Cer, ceramide; CE, cholesteryl ester.

## APPENDIX E

**Supplemental Figure 1** – Distribution of ceramide changes (Cer, %) throughout the cohort.

## APPENDIX F

**Supplemental Table 5** - Significant associations (Pearson test) between plasma lipids and apolipoproteins (n = 2 × 102, before and after Fenofibrate).

Parameters	r coefficient	p value
TG vs. adiponectin	-0.25	< 0.001
TG vs. apoC-II	0.40	< 0.001
TG vs. apoC-III	0.45	< 0.001
TG vs. apoE	0.35	< 0.001
HDL-C vs. adiponectin	0.41	< 0.001
HDL-C vs. apoA-I	0.36	< 0.001
HDL-C vs. apoA-II	0.44	< 0.001
LDL-C vs. apoB100	0.44	< 0.001
S1P vs. apoM	0.35	0.009

TG, triglycerides; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; apo, apolipoprotein; S1P, sphingosine-1-phosphate.

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Ce projet nous a permis de montrer l'intérêt de la spectrométrie de masse pour la recherche et la caractérisation de nouveaux marqueurs lipidiques d'intérêt. Nos outils ont été utilisés avec succès pour l'évaluation de l'efficacité d'un traitement hypolipémiant (Fénofibrate) chez une population à risque (diabétiques de type 2).

La mesure d'empreintes lipidiques implique ici l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution en couplage avec la chromatographie liquide (LC-HRMS). Nous avons développé au sein du laboratoire une méthode standard permettant la détection de plusieurs milliers de variables caractérisées par un temps de rétention (RT), un rapport  $m/z$  et une intensité. Au terme de plusieurs étapes de développement, nous avons pu constituer une base de données solide, attribuant à plus de 200 variables spécifiques (RT et  $m/z$ ) une espèce moléculaire précise. Ces attributions ont été réalisées en fonction des masses exactes mesurées en HRMS et des compositions élémentaires associées avec une précision de  $\pm 5$  ppm, la pertinence des temps de rétention aux propositions et l'interrogation de bases de données en ligne ([www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)). Enfin, les schémas de fragmentation obtenus, après une ionisation positive et négative (MS/MS), nous ont permis de statuer sur l'identification des espèces et de clairement caractériser leur structure ([Sandra et al. 2010](#) ; [Gallart-Ayala et al. 2013](#)). De nombreux composés standards commerciaux ont été utilisés pour ce développement méthodologique.

Dès lors, nous avons choisi de réaliser notre étude lipidomique sur un nombre limité d'échantillon ( $n = 76$ , 38 patients appariés avant/après traitement) afin de pouvoir réaliser le test sur une unique expérimentation et éviter ainsi les dérives analytiques (RT,  $m/z$ , intensité) et les mauvaises interprétations. Comme recommandé pour les études non-ciblées, plusieurs échantillons contrôles (QC,  $n = 20$ ) ont été inclus au test afin de vérifier la robustesse de l'analyse ([Dunn et al. 2011](#)). Après extraction des variables, nous avons identifié, sans a priori, celles correspondant à une espèce lipidique préalablement caractérisée dans notre base de données. Après élimination des données ne passant pas le test de répétabilité analytique ( $CV > 30\%$  dans les QC), les variables sélectionnées ont été soumises à des analyses statistiques multi-variées ([Dunn et al. 2011](#) ; [Gallart-Ayala et al. 2013](#)). Ceci constitue une première limite à notre étude car nous ne pouvons pas exclure qu'une analyse globale de l'ensemble des variables nous aurait amené à la mise en évidence d'autres marqueurs d'intérêt. La recherche d'une variable discriminante parmi les autres implique l'utilisation

d'outils statistiques adaptés en mesure d'intégrer un jeu de données important. Les compétences nécessaires à l'utilisation de tels outils requièrent de solides compétences. Avec l'aide de l'infrastructure MetaboHub, nous allons implanter ces compétences au laboratoire afin d'acquérir une parfaite autonomie dans la gestion de ces données.

Néanmoins, notre principal objectif était ici de trouver de nouvelles pistes pour de futures analyses quantitatives ciblées. Nous avons ainsi pu constater rapidement une diminution globale des céramides après le traitement Fénofibrate. Nous avons dès lors développé une analyse quantitative des principaux sphingolipides plasmatiques par LC-MS/MS afin de confirmer sans conteste notre première observation.

Afin de documenter les mécanismes potentiellement mis en œuvre dans la réduction des céramides plasmatiques, nous avons également appliqué notre méthode multiplexe LC-MS/MS pour la quantification des principales apolipoprotéines plasmatiques. Il aurait été intéressant de réaliser ces mêmes analyses (sphingolipides et apolipoprotéines) dans les sous-fractions lipoprotéiques (Boon *et al.* 2013 ; Ng *et al.* 2015), mais les volumes disponibles étaient insuffisants pour envisager une séparation par ultracentrifugation ou FPLC. Nos résultats ont tout de même permis d'entrevoir certains aspects physiologiques en relation avec la réduction des céramides observée. A noter que pour l'ensemble des tests réalisés lors de cette étude (lipidomiques, sphingolipides, apolipoprotéines), moins de 100 µL de plasma furent nécessaires, plaçant ainsi la spectrométrie de masse comme une alternative de choix dans la recherche en santé humaine.

Enfin, nos analyses ont permis de montrer que les céramides pourraient être d'intéressants marqueurs à considérer pour de futures analyses visant à évaluer l'intérêt du Fénofibrate sur les pathologies cardiovasculaires, notamment chez une population à risque. Malheureusement, nous n'avons pas pu évaluer cette incidence à cause du trop faible nombre d'échantillons à disposition dans cette étude.

## Article 6

### **Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry analysis for in vivo estimates of metabolic fluxes**

Croyal M, Bourgeois R, Ouguerram K, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Nguyen P, Krempf M, Ferchaud-Roucher V, Nobécourt E

*Anal Biochem.* **2016**, 500: 63-65.

Le traceur que nous utilisons pour l'analyse des flux lipidiques est le  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -acétate. Le niveau d'enrichissement  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  est majoritairement mesuré pour le cholestérol et ses dérivés estérifiés par GC-C-IRMS. Le principe de ce type de détecteur est de dégrader entièrement les molécules d'intérêt par combustion avant de mesurer précisément les rapports d'intensités des deux isotopes à l'échelle atomique. Cette technique de référence efface ainsi toute notion d'isotopologie et d'isotopométrie. Aussi, nous avons souhaité évaluer la viabilité de la GC-MS, plus simple et à l'échelle moléculaire, pour l'obtention de ces mesures dans un souci d'étendre le spectre de ces analyses à d'autres composés lipidiques. Ce type d'études avait déjà été réalisé par le passé, mais aucune d'entre elles n'avait étudié les différents niveaux d'isotopologie (Pont *et al.* 1997 ; Stellaard & Lütjohann 2015). La comparaison entre les deux méthodes a donc été effectuée sur le cholestérol de dix chiens perfusés en  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -acétate (sur 8 h). Bien que les valeurs moyennes laissent supposer une précision suffisante de la GC-MS pour ce type d'analyse, les courbes individuelles obtenues ont montré que la GC-C-IRMS reste la méthode de référence dans le cas d'études cinétiques. Ces imprécisions sont très critiques pour l'ajustement des modèles mathématiques lors de l'étape de modélisation. La GC-MS présente tout de même un intérêt certain pour la caractérisation isotopologique. En effet, le degré d'incorporation du traceur ne peut pas être mesuré par GC-C-IRMS. Cette donnée pourrait être représentative des divergences de mécanismes métaboliques comme en témoigne les résultats comparatifs obtenus chez le chien et l'Homme (n = 8) soumis à une perfusion de ce même traceur.





## Notes &amp; Tips

## Comparison of gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry analysis for in vivo estimates of metabolic fluxes



Mikaël Croyal<sup>a,b</sup>, Raphaëlle Bourgeois<sup>a,b</sup>, Khadija Ouguerram<sup>a,b</sup>,  
Stéphanie Billon-Crossouard<sup>a,b</sup>, Audrey Aguesse<sup>a,b</sup>, Patrick Nguyen<sup>b,c</sup>,  
Michel Krempf<sup>a,b,d,\*</sup>, Véronique Ferchaud-Roucher<sup>a,b</sup>, Estelle Nobécourt<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, CHU Hôtel-Dieu, F-44000 Nantes, France

<sup>b</sup> CRNH, Human Nutrition Research Center, CHU Hôtel-Dieu, F-44093 Nantes, France

<sup>c</sup> Oniris, National College of Veterinary Medicine, Food Science, and Engineering, Nutrition and Endocrinology Unit, F-44307 Nantes, France

<sup>d</sup> Endocrinology, G and R Laennec Hospital, F-44093 Nantes, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 September 2015

Received in revised form

31 December 2015

Accepted 4 February 2016

Available online 17 February 2016

## Keywords:

Metabolic flux analysis

GC–MS

GC–C–IRMS

Cholesterol enrichment

$^{13}\text{C}_{12}$ acetate

Isotopologue

## ABSTRACT

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was compared with gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry (GC–C–IRMS) for measurements of cholesterol  $^{13}\text{C}$  enrichment after infusion of labeled precursor ( $^{13}\text{C}_{12}$ acetate). Paired results were significantly correlated, although GC–MS was less accurate than GC–C–IRMS for higher enrichments. Nevertheless, only GC–MS was able to provide information on isotopologue distribution, bringing new insights to lipid metabolism. Therefore, we assessed the isotopologue distribution of cholesterol in humans and dogs known to present contrasted cholesterol metabolic pathways. The labeled tracer incorporation was different in both species, highlighting the subsidiarity of GC–MS and GC–C–IRMS to analyze in vivo stable isotope studies.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Carbon-13 ( $^{13}\text{C}$ ) labeling is often used to estimate the metabolic flux of lipids [1]. Gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry (GC–C–IRMS) is considered as the reference method to measure very low isotope enrichments by analyzing the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio in carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) [2]. This method requires expensive equipment. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) is more affordable but lacks sensitivity to get reliable data for low tracer enrichments in slow turnover compounds [3]. For labeled cholesterol, the comparison between the two methods has already been reported, showing more accurate and reproducible results with GC–C–IRMS [3,4]. In these studies,  $^{13}\text{C}$ -labeled

cholesterol tracers were used and a specific single ion was monitored with GC–MS. Spontaneous formation of different isotopologues is assumed to be null; however, this is not the case when a precursor of cholesterol synthesis (e.g.,  $^{13}\text{C}$ acetate) is used for endogenous labeling. A roadmap for interpreting  $^{13}\text{C}$  metabolite labeling patterns was recently reported and underlined the critical role of this approach for better comprehension of cell metabolism [5]. Here, we have extended the analysis of GC–MS results and compared  $^{13}\text{C}$  enrichments measured with both methods to cholesterol from blood samples collected in dogs and humans who received a constant intravenous infusion of  $^{13}\text{C}$ -labeled acetate. Both species are known to have large discrepancies in cholesterol metabolism [6,7]. Therefore, we first aimed to study the ability of GC–MS to provide accurate whole enrichment measurements from the isotopologue distribution. We then aimed to study how the isotopologue distribution analysis could reflect metabolic disturbances by comparing two species with different metabolic pathways.

**Abbreviations used:**  $^{13}\text{C}$ , carbon-13; GC–C–IRMS, gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry;  $\text{CO}_2$ , carbon dioxide; GC–MS, gas chromatography–mass spectrometry; HDL, high-density lipoprotein; APE, atom percentage excess; SD, standard deviation; AUC, area under the curve.

\* Corresponding author. Endocrinology, G and R Laennec Hospital, F-44093 Nantes, France.

E-mail address: [michel.krempf@univ-nantes.fr](mailto:michel.krempf@univ-nantes.fr) (M. Krempf).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2016.02.005>

0003-2697/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Subjects in this study were 8 hypertriglyceridemic human men and 10 obese insulin-resistant ovariectomized female dogs. A primed constant [ $^{13}\text{C}_{12}$ ]acetate intravenous infusion (2  $\mu\text{mol/kg/min}$ ) was performed for 8 and 14 h in fasting dogs and humans, respectively [7,8]. Plasma samples were collected in EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) tubes at several time points, and high-density lipoprotein (HDL) fractions were prepared by density gradient ultracentrifugation [8]. The ethics committee of the veterinary school of Nantes and the ethics committee of Nantes University Hospital approved the protocols.

Cholesterol was extracted from HDL fractions (100  $\mu\text{l}$ ) with 1 ml of a cyclohexane/isopropanol mixture (3:2, v/v). After centrifugation (14,000  $\times g$ , 10 min), the supernatants were dried under a nitrogen stream at 60  $^{\circ}\text{C}$ . For GC–C–IRMS, dried samples were acetylated with 220  $\mu\text{l}$  of an acetic anhydride/pyridine (10:1, v/v) mixture (90  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min). For GC–MS analysis, dried samples were derivatized with 50  $\mu\text{l}$  of *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (70  $^{\circ}\text{C}$ , 40 min). After derivatization, samples were dried again under a nitrogen stream at 60  $^{\circ}\text{C}$  and reconstituted with 500  $\mu\text{l}$  of cyclohexane before both method analyses. All reagents and chemical products were obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Cholesterol was eluted on an HP-1MS column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  film, Agilent Technologies), and helium was used as gas vector at a flow rate of 1.2 ml/min. Here, 1  $\mu\text{l}$  was injected into the analytical systems, and the injector was set at 250  $^{\circ}\text{C}$ . Separation was achieved using a temperature gradient (50  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  from 150 to 275  $^{\circ}\text{C}$ , 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to 285  $^{\circ}\text{C}$ , 15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to 300  $^{\circ}\text{C}$ , 300  $^{\circ}\text{C}$  for 4.5 min), and both mass spectrometers ran on electron impact mode for ionization. For GC–C–IRMS, the combustion oven was set at 940  $^{\circ}\text{C}$ . For GC–MS (5890 from Hewlett Packard for GC, Finnigan Mat Delta S),  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios were calculated from a  $\text{CO}_2$  reference gas and expressed as atom percentage excess (APE), indicating excess isotope tracer compared with baseline, prior to the start of the infusion. For GC–MS (6890 and 5975C inert from Agilent Technologies) measurements, a major fragment ion at  $m/z$  368 and corresponding to the full carbon skeleton of cholesterol was analyzed in order to avoid isotopic carbon contribution from derivatization reagent. The SIM (single ion monitoring) mode was used at  $m/z$  368, 369, 370, 371, and 372 for unlabeled cholesterol (M0) and mono-labeled (M1), di-labeled (M2), tri-labeled (M3), and tetra-labeled (M4) cholesterol, respectively, corresponding to the detectable isotopologues [9]. Higher  $m/z$  values, corresponding to additional isotopologues, were not detected in HDL samples. Chromatographic peak area ratios of M1/M0, M2/M0, M3/M0, and M4/M0 were calculated at every time point. These ratios were subtracted by their ratio at baseline corresponding to the natural isotopic abundance. For each time point, the peak area ratios were summed to consider all detectable isotopologues [10]. APE was calculated by dividing these sums by the putative number of isotopomers corresponding to the number of carbon (i.e., 27) and assuming a negligible contribution of hydrogen isotopes (<0.5%) [10,11].

APEs obtained by GC–MS and GC–C–IRMS were compared. Mean APE values obtained for cholesterol were similar with both methods employed. As shown in Fig. 1, a significant correlation was observed ( $y = 0.819 \times x + 0.003$ ,  $P < 0.0001$ ,  $r = 0.8303$ ), but an increase of discrepancies was noticed for higher enrichments. A Bland–Altman test [12] was then performed to accurately compare both methods for measurement of cholesterol enrichments. Averages of APE obtained by GC–MS and GC–C–IRMS were calculated and then plotted against the difference of the two measurements. The mean difference and the limits of agreement, corresponding to the 95% of confidence (i.e. mean  $\pm$  1.96  $\times$  standard deviation [SD]), were drawn (Fig. 1). Most of the points (94%) were between the

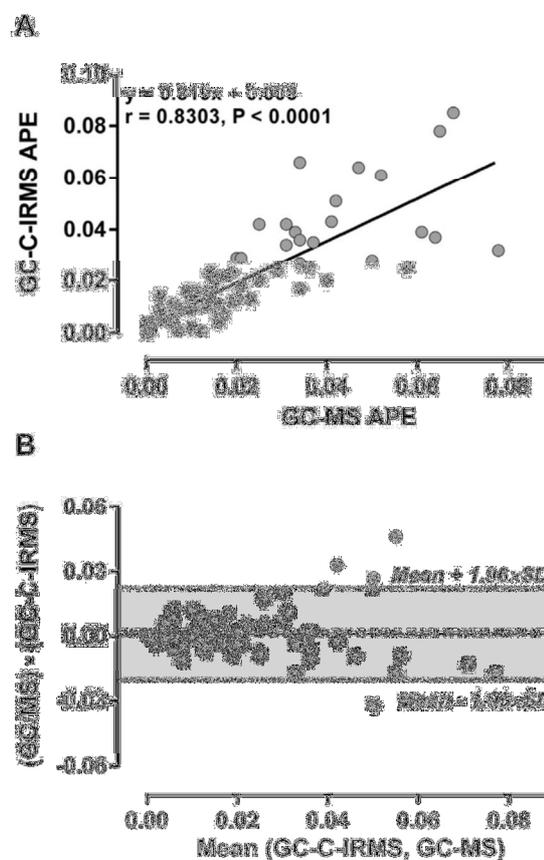
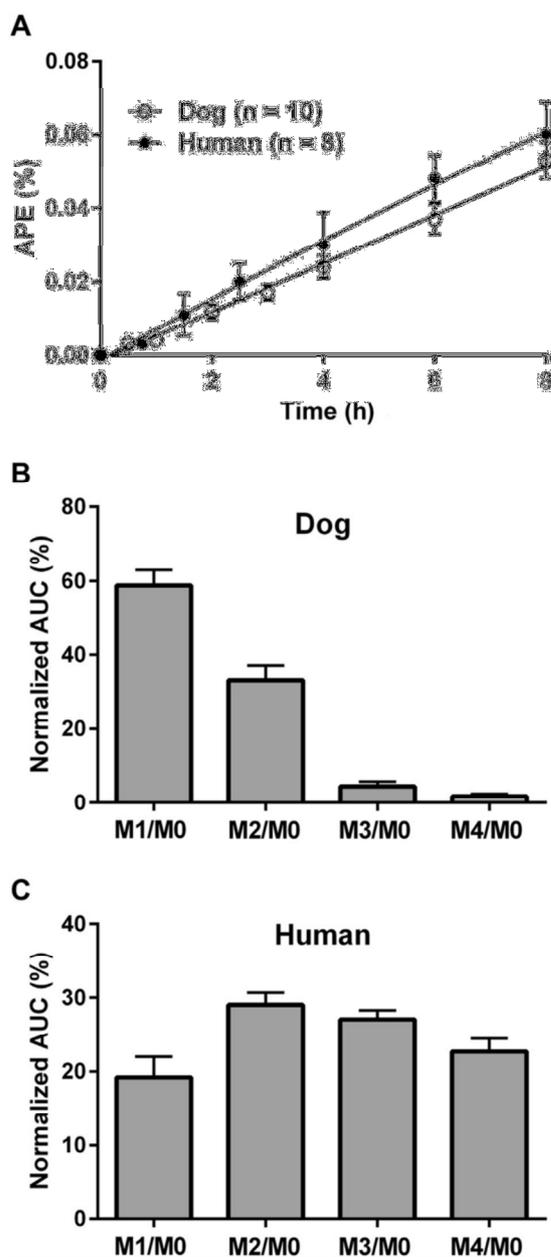


Fig. 1. (A) Linear correlation obtained between GC–MS and GC–C–IRMS methods for cholesterol enrichment measurements. (B) Comparison of cholesterol enrichment measurements obtained by GC–MS and GC–C–IRMS methods using the Bland–Altman test.

limits of similarity, but large variations on both sides were observed for higher enrichments corresponding to the latest points of the kinetic curves.

These variations could be explained by the low resolution of the quadrupole mass analyzer used for GC–MS analysis, with an increasing risk of overlap during ion detection between  $m/z$  and  $m/z \pm 1$  ratio, especially for the highest enrichments, as reported previously [3]. In this review, Stellaard and Lütjohann explored the limitation of conventional methodologies and described experimental procedures to get reliable results whatever the analytical approach used but with a labeled cholesterol tracer and not a precursor of synthesis as [ $^{13}\text{C}_{12}$ ]acetate. With the compartmental models used in kinetic studies, these variations observed for the latest time points with the highest enrichments are critical for the best fit assessment and to get reliable catabolic or synthesis rates.

As illustrated in Fig. 2, the mean kinetic curves obtained by GC–MS were similar in humans and dogs. Kinetic curves were plotted for each isotopologue (i.e., from M1/M0 to M4/M0), and areas under the curves (AUCs) were calculated. As shown in Fig. 2, normalized AUC highlighted the cholesterol isotopologue distribution obtained by GC–MS in humans and dogs. The incorporation of the labeled tracer was different in both species, underlying a contrast in cholesterol metabolism between these two species already known with the dramatic difference of cholesterol ester



**Fig.2.** (A) Mean kinetic curves obtained with GC-MS in dog and human HDL for cholesterol. (B,C) Isotopologue fraction distribution measured by GC-MS for cholesterol in dog HDL (B) and human HDL (C). Values are means  $\pm$  standard errors,  $n = 10$  (dogs) and  $n = 8$  (humans).

transfer protein activity as an example [6,7,13]. This so-called "isotope effect" was previously reported in vivo in rats as a

marker of differential synthesis between organs and metabolic disturbances [14,15]. How this finding applied to identify differences in cholesterol metabolism in human diseases is unknown, but it opens new avenues of research. Therefore, although data from GC-MS analysis seemed less accurate than those obtained by GC-C-IRMS for modeling data in kinetic studies, they could bring additional information on metabolic disturbances from the isotopologue distribution analysis when labeled precursors of synthesis of the studied compounds are used.

#### Acknowledgment

We are grateful to the Biogenouest CORSAIRE core facility for its financial support.

#### References

- [1] S.B. Crown, M.R. Antoniewicz, Parallel labeling experiments and metabolic flux analysis: past, present, and future methodologies, *Metab. Eng.* 16 (2013) 21–32.
- [2] Y. Zhang, H.J. Tobias, G.L. Sacks, J.T. Brenna, Calibration and data processing in gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 4 (2012) 912–922.
- [3] F. Stellaard, D. Lütjohann, Fractional cholesterol absorption measurements in humans: determinants of the blood-based dual stable isotope tracer technique, *J. Clin. Lipidol.* 9 (2015) 14–25.
- [4] F. Pont, L. Duvillard, C. Maugeais, A. Athias, L. Perségol, P. Gambert, B. Vergès, Isotope ratio mass spectrometry, compared with conventional mass spectrometry in kinetic studies at low and high enrichment levels: application to lipoprotein kinetics, *Anal. Biochem.* 248 (1997) 277–287.
- [5] W.D. Hollinshead, W.R. Henson, M. Abernathy, T.S. Moon, Y.J. Tang, Rapid metabolic analysis of *Rhodococcus opacus* PD630 via parallel  $^{13}\text{C}$ -metabolite fingerprinting, *Biotechnol. Bioeng.* 113 (2016) 91–100.
- [6] K. Ouguerram, M. Krempf, C. Maugeais, P. Maugeire, D. Darmaun, T. Magot, A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans, *Metabolism* 51 (2002) 5–11.
- [7] K. Ouguerram, P. Nguyen, M. Krempf, E. Pouteau, F. Briand, E. Bailhache, T. Magot, Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl ester in the dog, a species lacking in cholesteryl ester transfer protein activity: an in vivo approach using stable isotopes, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 138 (2004) 339–345.
- [8] E. Bailhache, F. Briand, P. Nguyen, Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer, *Eur. J. Clin. Invest.* 34 (2004) 527–534.
- [9] R. Guearrazio, C. Haberhauer-Troyer, M. Steiger, M. Sauer, D. Mattanovich, G. Koellensperger, S. Hann, Measurement uncertainty of isotopologue fractions in fluxomics determined via mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5133–5146.
- [10] B. Lindenthal, T.A. Aldaghlis, A.L. Holleran, T. Sudhop, H.K. Berthold, K. Von Bergmann, J.K. Kelleher, Isotopomer spectral analysis of intermediates of cholesterol synthesis in human subjects and hepatic cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282 (2002) 1222–1230.
- [11] H. Brunengraber, J.K. Kelleher, C. Des Rosiers, Applications of mass isotopomer analysis to nutrition research, *Annu. Rev. Nutr.* 17 (1997) 559–596.
- [12] J.M. Bland, D.G. Altman, Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet* 1 (1986) 307–310.
- [13] K. Tsutsumi, A. Hagi, Y. Inoue, The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 579–581.
- [14] J. Férézou, J.C. Sulpice, C. Lutton, Evidence for different isotopic enrichments of acetyl-CoA used for cholesterol synthesis in the liver and intestine: a study in the rat by mass fragmentography after intravenous infusion of [ $^{13}\text{C}$ ]acetate, *Biochim. Biophys. Acta* 875 (1986) 227–235.
- [15] J.P. Godin, A.B. Ross, S. Rezzi, C. Poussin, F.P. Martin, A. Fuerholz, M. Cléroux, A.F. Mermoud, L. Tornier, F. Arce Vera, E. Pouteau, Z. Ramadan, S. Kochhar, L.B. Fay, Isotopomics: a top-down systems biology approach for understanding dynamic metabolism in rats using [ $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ ]acetate, *Anal. Chem.* 82 (2010) 646–653.



## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Cette étude nous a permis d'aborder l'analyse des flux lipidiques à nos analyses. Nous avons voulu évaluer la capacité des systèmes analytiques conventionnels à mesurer des enrichissements dans des protocoles impliquant des traceurs endogènes. Nous avons ainsi confirmé que dans le cas de composés à taux de renouvellement lent et présentant de faibles niveaux d'enrichissement, les couplages GC-C-IRMS sont plus sensibles et plus précis que les systèmes de type GC-MS et très probablement que ceux du type LC-MS/MS (Pont *et al.* 1997 ; Stellaard & Lütjohann 2015). A noter que cette observation est réellement valide dans le cas présent où le traceur choisi ( $^{13}\text{C}_{1,2}$ -acétate) entraîne la formation de nombreux isotopologues, chacun associé à de nombreux isotopomères. La comparaison des deux systèmes nécessitant la conversion des données GC-MS (échelle moléculaire) en valeurs d'APE obtenues par GC-C-IRMS (échelle atomique), il n'est pas exclu que des erreurs de conversion, liées à une mauvaise estimation de la répartition isotopomérique, puissent biaiser les résultats. Globalement, bien que moins précise, l'analyse par GC-MS (et par extension par LC-MS/MS) reste possible à condition d'obtenir les données nécessaires à la modélisation selon la même approche (pool précurseur). De manière plus générale, le choix d'un traceur plus spécifique d'une classe de lipides ou apportant un enrichissement plus facilement ou précisément détectable (décalage en masse plus élevé), pourrait remplacer les approches par GC-MS ou LC-MS/MS comme méthodes de choix pour ce type d'analyse (Castro-Perez *et al.* 2011 ; Previs *et al.* 2014).

Notre étude a cependant montré que les analyses utilisant des systèmes conventionnels (GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS) présentent un intérêt non négligeable pour la caractérisation isotopologique de marqueurs lipidiques dans ce type de protocoles. Cette répartition isotopologique est très probablement régie par les nombreuses réactions enzymatiques nécessaires à la production des composés de l'organisme. Dès lors, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une étude approfondie des isotopologues, générés dans différents compartiments ou tissus après administration d'un traceur bien spécifique, pourrait élever notre niveau de connaissance quant aux connexions métaboliques mises en œuvre entre ces compartiments. En outre, il n'est pas impossible que cette répartition isotopologique puisse être altérée en fonction d'un état physiopathologique pour un même compartiment. Enfin, la répartition isotopologique naturelle de ces marqueurs moléculaires pourrait être le reflet de dysfonctionnements métaboliques relatifs à divers effets isotopiques.

Malgré ces premiers résultats prometteurs, nous avons choisi de ne pas réaliser d'investigations supplémentaires dans ce domaine. En effet, la complexité des données générées et le grand nombre de questions qui y sont associées pourront faire l'objet d'un nouvel axe de recherche. En outre, l'utilisation de nouveaux traceurs, comme l'eau marquée, pourrait permettre une analyse plus approfondie et plus variée de cette thématique ([Shankaran et al. 2016](#)).

## Article 7

### **Stable isotope kinetic study of Apolipoprotein M**

Croyal M, Billon-Crossouard S, Goulitquer S, Leon L, Fall F, Chétiveaux M, Aguesse A,  
Moyon T, Nobécourt E, Krempf M

En cours de rédaction

Après synthèse et sécrétion dans la circulation sanguine, l'apoM est connue pour se lier majoritairement aux HDL avant d'être distribuée de façon minoritaire aux lipoprotéines contenant de l'apoB (Ren *et al.* 2015). L'apoM appartient à la famille des lipocalines et peut véhiculer de petits lipides fonctionnels tels que la sphingosine-1-phosphate (S1P). Elle est ainsi considérée comme le transporteur de la S1P au sein des lipoprotéines, et le couple apoM-S1P pourrait préserver de l'athérosclérose (Borup *et al.* 2015). Quelques études cinétiques ont déjà établi un lien entre le métabolisme des HDL et des LDL avec les concentrations plasmatiques de l'apoM (Ooi *et al.* 2010 ; Christoffersen *et al.* 2012). En revanche, aucune étude ne s'est concentrée sur les cinétiques même de l'apoM, ni sur l'action du couple apoM-S1P sur le métabolisme des HDL et des LDL.

L'utilisation de nos nouveaux outils analytiques nous a permis d'acquérir un jeu de données quantitatives et cinétiques pour plusieurs patients (n = 14). Nous avons ainsi confirmé la présence d'apoM dans les fractions HDL (majoritaire) et LDL (minoritaire). Une fraction plasmatique libre, indépendante des lipoprotéines, a également été mise en évidence, et nos résultats ont confirmé la forte association apoM-S1P dans tous les compartiments plasmatiques. L'aspect global des courbes d'enrichissements, ainsi que les diverses corrélations obtenues entre nos données, ne nous ont pas permis de développer et de valider un modèle à plusieurs compartiments permettant d'expliquer les flux d'apoM entre les différentes classes de lipoprotéines. Cependant, l'analyse cinétique de l'apoM par modèles mono-compartimentés a montré que la voie des LDL semble être la principale source d'épuration de l'apoM. En outre, l'apoM pourrait être distribuée et échangée rapidement entre les particules de HDL et de LDL via le compartiment plasmatique libre servant de « réservoir ». Enfin, cette disposition à être échangée et retenue dans la fraction libre semble liée au profil lipidique des patients (triglycérides, cholestérol, HDL bas et/ou LDL haut).



## Stable isotope kinetic study of Apolipoprotein M

Mikaël Croyal<sup>1,2</sup>, Stéphanie Billon-Crossouard<sup>1,2\*</sup>, Sophie Goulitquer<sup>3\*</sup>, Audrey Aguesse<sup>1,2</sup>, Luis Leon<sup>1</sup>, Fanta Fall<sup>1,2</sup>, Maud Chétiveaux<sup>2</sup>, Thomas Moyon<sup>1</sup>, Khadija Ouguerram<sup>1,2</sup>, Estelle Nobécourt<sup>1,2,4</sup>, and Michel Krempf<sup>1,2,5\*</sup>.

\* These authors contributed equally to the study

<sup>1</sup>INRA, UMR 1280, CHU Hôtel-Dieu, Faculty of Medicine, University of Nantes, France. <sup>2</sup>CRNHO, West Human Nutrition Research Center, Nantes, France. <sup>3</sup>INSERM-UBO, UMR 1078-ECLA, IBSAM, Faculty of Medicine, University of Brest, France. <sup>4</sup>CHU de la Réunion, Faculty of Medicine, University of la Réunion, Saint-Denis, France. <sup>5</sup>Department of Endocrinology, Metabolic diseases and Nutrition, G and R Laennec Hospital, Nantes, France.

**\*Corresponding author:** Pr. Michel Krempf, phone: +33(0) 240 083 073, E-mail: michel.krempf@univ-nantes.fr. IRS-UN - 8, quai Moncoucu - 44000 Nantes – France.

**Running title:** Apolipoprotein M kinetics in human

**Abbreviations:** Apo, apolipoprotein; DPR, direct production rate; ESI, electrospray ionization; FCR, fractional catabolic rate; FPLC, fast protein liquid chromatography; HDL, high-density lipoprotein; HDL-C, HDL cholesterol; IDL, intermediate-density lipoprotein; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LDL, low-density lipoprotein; LDL-C, LDL cholesterol; non-HDL-C, non-HDL cholesterol; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PR, production rate; S1P, sphingosine-1-phosphate; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; VLDL, very-low-density lipoprotein.

**ABSTRACT**

Apolipoprotein M (apoM) binds to HDL before to be exchanged with apoB-containing lipoproteins. ApoM is a chaperone of sphingosine-1-phosphate (S1P) within lipoproteins, and both compounds could promote atherosclerosis prevention. We aimed to describe the apoM kinetics to better define its potential benefit on atherosclerosis. Fourteen male subjects received a primed infusion of  $^2\text{H}_3$ -Leucine for 14h and analyses were then performed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry from the hourly plasma samples. The fractional catabolic rates (FCR) and production rates (PR) of HDL-apoA-I, HDL-apoA-II and apoM were calculated using mono-compartmental models. A multiple-compartmental model was used for LDL-apoB100. ApoM FCR and PR were  $0.712 \pm 0.049$  pool/d and  $0.89 \pm 0.10$  mg/kg/d in plasma,  $0.275 \pm 0.024$  pool/d and  $0.19 \pm 0.02$  mg/kg/d in HDL,  $0.219 \pm 0.013$  pool/d and  $0.01 \pm 0.00$  mg/kg/d in LDL, respectively. We also found apoM in a non-lipoprotein related compartment (NLR) with a FCR of  $0.314 \pm 0.051$  pool/d and a PR of  $0.19 \pm 0.06$ . Our results showed that apoM could be bound to HDL after secretion, and then quickly exchanged, via the NLR compartment, to LDL to be slowly catabolized. Unfortunately, we were not able to define a multiple-compartmental model to fully describe apoM fluxes between compartments. However, the relationships between S1P and apoM were confirmed, even into the NLR compartment. Our results showed plasma triglycerides play a central role in both apoM and S1P distribution between lipoproteins and confirmed the key role of LDL fluxes in apoM turnover. Hence, our results raised new insights for further investigations, which will be required to define its potential benefit on atherosclerosis.

**KEYWORDS:** apolipoprotein M, sphingosine-1-phosphate, stable isotope kinetic study, modeling

## INTRODUCTION

Apolipoprotein M (apoM) is known to be associated with high-density lipoprotein (HDL), although a small proportion binds to apoB-containing lipoproteins, as low-density lipoproteins (LDL) (1-3). ApoM was shown to be involved in both lipoprotein and lipid metabolism (3), and could also be a mediator of several atheroprotective effects attributed to HDL (4-7). ApoM is mainly produced by the liver and the kidney (8, 9), and its plasma concentration correlates positively with total cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDL-C) and LDL cholesterol (LDL-C) (10). ApoM is a member of lipocalin family and owns a hydrophobic pocket enabling the binding of small functional lipids, such as sphingosine-1-phosphate (S1P) (3). S1P is known to have protective actions on the cardiovascular system, and apoM constitutes its main plasma carrier with the albumin (11). However, the atheroprotective effects attributed to apoM in association with S1P remains an open question (12).

Kinetic studies with stable isotope tracers have provided important knowledge in lipoprotein metabolism (13), recently improved by new advances in mass spectrometry (14-16). These new approaches, based on enzymatic proteolysis and targeted analysis of specific peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), allowed the measurements of apolipoproteins not routinely studied (14). Previous reports have shown that plasma apoM concentrations were negatively associated with catabolic rates of HDL (17) and LDL (18). To our knowledge, no study focused on the apoM kinetics excepted one from Singh *et al* who analyzed the kinetics of several apolipoproteins in different HDL sub-fractions (16). Here, we aimed to perform several static and kinetic measurements of a wide range of lipoprotein components, including apoM, to give further insights on its metabolism and the potential links with cardiovascular prevention.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects and sample collection

Fourteen male subjects carrying a broad range of lipid parameters (age: 18-63 years, body mass index: 18.1-34.0 kg/m<sup>2</sup>, 6 healthy subjects, 8 subjects with a mild hypertriglyceridemia) were enrolled. After an overnight fasting, each subject received a bolus of 10 µmole/kg <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine, immediately followed by a constant infusion (10 µmole/kg/h) for 14 h. Blood samples were collected at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 h, and the plasma was separated by centrifugation at 4 °C for 30 min.

Plasma lipoprotein fractions, including very-low-density lipoprotein (VLDL), intermediate-density lipoprotein (IDL), LDL and HDL, were separated by sequential ultracentrifugation methods (19, 20) and by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) as previously described (21). Samples were stored at -80 °C until analysis.

The Ethics Committee of Nantes University Hospital approved the clinical protocol, and a written informed consent was obtained from each subject (CPPRB Pays de la Loire reference: 0266; reference trial number: NCT01216956).

### **Biochemical measurements**

Cholesterol and triglyceride (TG) concentrations were measured using enzymatic test kits from Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany) and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) plasma concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Lille, France). Non-HDL cholesterol (non-HDL-C) concentrations were calculated (non-HDL-C = TC – HDL-C).

### **Sphingosine-1-phosphate quantification**

S1P was quantified in plasma and lipoprotein fractions by a validated LC-MS/MS assay as described previously (22). The intra- and inter-assay variability of the analytical method was below 8% and recoveries were greater than 94%.

### **Apolipoprotein quantification and enrichment measurements**

ApoA-I, apoA-II, apoB100, apoC-II, apoC-III, apoE and apoM were quantified in plasma and lipoprotein fractions using trypsin proteolysis and the subsequent analysis of proteotypic peptides by LC-MS/MS as described previously (15, 23).

<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine enrichment measurements were assessed for apoA-I, apoA-II, apoB100 and apoM in lipoproteins fractions and plasma (apoM) using the same approach and data analysis was achieved as described in previous works (15, 24). For apoM, the analytical method was updated for mass spectrometry detection ([supplemental Table S1](#)).

Apolipoprotein quantification and enrichment measurements were performed on 3 replicates of all kinetic time points. The intra- and inter-assay variability did not exceed 12%. The S1P/apoM molar ratio was calculated assuming an apoM molecular weight of 21,253 Daltons.

### **Kinetic analysis**

Kinetic analysis was performed using the SAAM II modeling program (Epsilon Group, Charlottesville, VA, USA). HDL-apoA-I and HDL-apoA-II fractional catabolic rates (FCR) were estimated from the 14-hour samples with a mono compartmental model as described previously (15, 25). Kinetic parameters of apoM were also calculated using a mono compartmental model. Kinetic data of LDL-apoB100 were calculated using a three compartmental model including VLDL- and IDL-apoB100 enrichment measurements as previously described (26). Asymptotic VLDL-apoB100 plateau was used as pool precursor and pool sizes were considered to be constant as no significant variation was observed on apolipoprotein concentrations at different sampling times (concentration variations within 10%). According to this steady state, the FCR was equal to the fractional synthetic rate (FSR). Production rates (PR) were calculated by the product of the FSR and the pool sizes of apolipoproteins in lipoprotein fractions or plasma and assuming a plasma volume of 4.5% of body weight.

### Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error to the mean (SEM, unless otherwise specified), and coefficients of variation (CV, %) were calculated to express the inter-individual variability. Univariate statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 6.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Results were compared using the nonparametric Spearman correlation test (two-tailed). Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Correlation networks were built to help visualizing variables with the same behavior. Correlation factors were calculated under R environment using the “cor” command. The correlation networks were calculated and visualized using the Cytoscape software (27) (<http://www.cytoscape.org/>) only including correlation coefficients  $> 0.5$ .

## RESULTS

### Plasma apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate

The patients displayed a broad range of lipid and apolipoprotein concentrations (Table 1), and total plasma apoM (1.7-4.5 mg/dL or 0.8-2.1  $\mu\text{mol/L}$ ) and S1P (122.3-396.4 nmol/L) were in the usual reported ranges. As expected, S1P and apoM were mainly recovered in HDL fractions (36% and 59%, respectively) and, in a lower extent, in LDL fractions (8% and 4%, respectively). We also observed that 56% of S1P and 37% of apoM appeared to be non-lipoprotein related (NLR). This was not due to technical processes as we obtained similar recovery with sequential ultracentrifugation and FPLC methods (supplemental Figure S1).

Assuming a mean of three apoA-I units per HDL particles, we estimated that  $5.1 \pm 0.4$  % (range 2.7-7.3%) of HDL particles could carry one unit of apoM. These ratios were relatively homogeneous (CV =28.2%) although HDL particles are able to carry from two to four apoA-I units. In LDL, we estimated that  $4.8 \pm 0.8$  % (range 0.9-9.1%) of particles could carry one unit of apoM. Considering one apoB100 per LDL particle, these ratios were relatively heterogeneous (CV =66.3%) but significantly associated with plasma TG ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.001$ ), TC ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.05$ ) and non-HDL-C ( $r = 0.70$ ,  $p = 0.007$ ). This strong variability was also observed for both NLR-S1P and NLR-apoM concentrations, which were significantly correlated with plasma TG ( $r = 0.85$ ,  $p < 0.001$  and  $r = 0.71$ ,  $p = 0.006$ , respectively). The S1P/apoM molar ratios calculated in each sub-fraction were  $0.22 \pm 0.08$ ,  $0.77 \pm 1.06$ ,  $0.14 \pm 0.04$  and  $0.43 \pm 0.10$ , for total plasma, NLR, HDL and LDL, respectively. These ratios were again mainly heterogeneous in the NLR compartment (CV =137%) compared to the others (total plasma, CV =37.6%; HDL, CV = 31.6%; LDL, CV =22.5%).

As expected (Figure 1), S1P and apoM concentrations were significantly correlated in all plasma compartments, with the strongest association in the LDL fraction. Additional associations with S1P and apoM are shown in supplemental Table S2. We observed strong associations between total plasma and LDL apoM concentrations ( $r = 0.71$ ,  $p = 0.006$ ), and between total plasma and LDL S1P

concentrations ( $r = 0.63$ ,  $p = 0.019$ ). Other associations obtained between lipids and apolipoproteins were investigated ([supplemental Tables S3, S4 and S5](#)), and the most relevant of them are represented in [Figure 2](#). In plasma, we found significant associations between apoM and apoA-II, TG or non-HDL-C. In both LDL and NLR fractions, apoM concentrations were positively associated with plasma TG, TC and their related parameters (plasma apoB100, PCSK9, apoC-II, apoC-III, apoE). Finally, in HDL, apoM concentrations were positively associated with HDL-apoA-I and HDL-apoA-II concentrations. Similar results were observed for S1P, but no significant association was obtained between S1P/apoM molar ratios and the other lipid data.

### **Apolipoprotein kinetics**

Both total plasma and HDL apoM enrichment curves were similar ([Figure 3](#)). Enrichment curves obtained for apoM in both HDL and LDL fractions were within the same range than those obtained for HDL-apoA-I and LDL-apoB100, respectively. LDL-apoM enrichments presented a slight delay in comparison to those measured in HDL-apoM, suggesting that apoM could be released into the plasma via the HDL fractions and then exchanged to the LDL. In addition, apoM did not reach the asymptotic enrichment plateau in both compartments suggesting of slow turnover rate. Of note, NLR-apoM enrichments (bottom fractions from ultracentrifugation) were similar with those obtained in total plasma ([supplemental Figure S2](#)).

From these enrichment data and the previous associations reported above, we were not able to define a common multiple compartmental model describing apoM kinetics in all lipoprotein fractions and for all the subjects. Therefore, we applied several mono compartmental models. Kinetic parameters obtained for apoM, apoA-I, apoA-II and apoB100 are summarized in [Table 2](#).

As shown in [Table 3](#), plasma apoM FCR was strongly associated with LDL kinetics and especially with LDL-apoB100 FCR ( $r = 0.68$ ,  $p = 0.010$ ). Significant correlations were also found between LDL-apoB100 FCR and LDL-apoM FCR ( $r = 0.77$ ,  $p = 0.002$ ), NLR-apoM FCR ( $r = 0.75$ ,  $p = 0.003$ ) and NLR-apoM PR ( $r = 0.57$ ,  $p = 0.035$ ). No association was found between HDL-apoM and HDL-apoA-I or HDL-A-II kinetics.

Plasma apoM FCR also correlated with LDL-apoM FCR ( $r = 0.54$ ,  $p = 0.048$ ), NLR-apoM FCR ( $r = 0.56$ ,  $p = 0.041$ ) and NLR-apoM PR ( $r = 0.68$ ,  $p = 0.009$ ), while plasma apoM PR correlated with NLR-apoM FCR ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.045$ ), NLR-apoM PR ( $r = 0.81$ ,  $p = 0.001$ ) and LDL-apoM PR ( $r = 0.78$ ,  $p = 0.001$ ). We also noticed strong associations between the FCRs of NLR-apoM and LDL-apoM ( $r = 0.70$ ,  $p = 0.007$ ), between PRs of NLR-apoM and LDL-apoM ( $r = 0.76$ ,  $p = 0.002$ ), and between PRs of NLR-apoM and HDL-apoM ( $r = -0.64$ ,  $p = 0.015$ ). All together, these observations suggested the apoM kinetics in lipoproteins were mainly driven by the LDL catabolic pathway.

Finally, plasma apoM PR was significantly associated with plasma PCSK9 concentrations, an effect also observed in both NLR and LDL compartments ([Figure 4](#)). We also found significant associations between apoM PRs and several lipid parameters ([supplemental Table S6](#)) suggesting that both TG and

LDL metabolisms could play a central role in apoM regulation. S1P concentrations were also strongly associated with apoM PRs in the different sub-fractions but not with the corresponding apoM FCRs. In addition, apoM FCRs did not correlate with lipid parameters except for HDL compartment, where an inverse association was found with HDL-apoA-I concentrations ( $r = -0.60$ ,  $p = 0.024$ ), underlying the influence of HDL in apoM metabolism. Additional associations found between apoM or S1P concentrations and kinetic parameters of apolipoproteins are available in the [supplemental Table S7](#).

## DISCUSSION

Some cardiovascular beneficial effects of HDL were recently reported to be related to apoM, a physiological carrier of S1P. Chemistry of apoM and its anchorage in HDL via a retained signal peptide is well characterized, but little is known on its own metabolism (28). Most of the information came from animal models or extreme patients (3, 5, 17, 18), and kinetic studies with stable isotopes were warranted to understand how apoM is metabolized in humans (18). We therefore aimed to study apoM kinetics throughout plasma lipoproteins and we observed a relationship between LDL catabolic pathway and apoM kinetics. We do confirm a high affinity of apoM and S1P with HDL particles, and we also underlined that plasma TG are involved in apoM distribution and kinetics in the lipoprotein fractions.

We first observed that apoM is primarily associated to HDL, even if a small proportion was found in apoB-containing lipoproteins, mainly LDL as previously reported (1, 2). We showed plasma apoM concentrations correlated with non-HDL-C but surprisingly not with HDL-C, LDL-C and TC as shown before (10, 17). This is probably due to the low number of included subjects, as the previous reports analyzed more patients (from 60 to 566) and obtained significant but slight correlations ( $r$  coefficient from 0.4 to 0.5). We also confirmed the strong association between apoM and S1P in total plasma, HDL and LDL (3, 11), but also in a non-lipoprotein related compartment (NLR).

This NLR fraction was not extensively described as most of the studies focused on apoM distribution within plasma lipoproteins using gel electrophoresis or related methods (1, 2). Using two different approaches, we have identified an apoM fraction not carried by lipoproteins, which also contributed to the carriage of S1P in plasma besides the albumin (11). Both apoM and S1P varied heterogeneously in this compartment between the subjects in association with plasma TG. In addition, it was established that approximately 2% of LDL and 5% of HDL could carry apoM molecules (3). This was confirmed for HDL, while we noticed a strong heterogeneity in LDL, again in association with plasma TG. This influence of plasma TG on apoM concentrations was previously described (3, 18) and was suggested as a possible explanation to the increased levels of S1P reported in obese patients (29). A previous study also concluded that the ability of apoM to exchange between plasma lipoproteins could be related to a quick replenishment of the pool of apoM in LDL from those of HDL, and subsequently to the catabolism of an apoM unit via the clearance of apoB-containing particles (18). In this report, the

authors also showed, as we observed, that elevated plasma TG increased apoM concentrations in LDL. On the same lines, another study demonstrated that apoM was bound preferentially in plasma LDL in patients with low HDL-C, usually observed with increased TG in the so-called “atherogenic dyslipidemia” (30). Our data reinforce the role of the atherogenic lipid profile as TG influenced apoM contents in LDL, but also in NLR fractions as well as S1P plasma concentrations. We can therefore speculate that plasma TG play a critical role for the transfer of apoM towards LDL particles. Unfortunately, from our kinetic data, we could not identify any mechanism as we did not observe any correlation between VLDL-apoB100 kinetics (not shown) and apoM concentrations or kinetics. It is likely that TG could modulate the strength of the apoM linkage by changing the composition of the HDL and LDL. A recent study has already pointed out the 10-fold stronger affinity of S1P/apoM with LDL compared to HDL (31). High TG could amplify this difference and facilitate the exchange of apoM from HDL to LDL but this need to be demonstrated.

After synthesis, apoM is supposed to be secreted into the plasma where it binds to HDL (3) before to be exchanged with apoB-containing lipoproteins (18). Our kinetic measurements were in line with this hypothesis as we observed a slight delay between both HDL- and LDL-apoM kinetic curves. However, we were not able to establish an “unique” multiple compartmental model able to describe the apoM kinetics and fluxes between all lipoprotein sub-fractions. Several combinations were tested to describe exchanges between HDL, NLR and LDL compartments. Despite to get great fittings of the curves, it was not possible to combine a high level of precision with a satisfactory balance of mass rates between the pools for all the studied subjects. This situation was previously reported for apoC-III for example and was likely a consequence of an insufficient set of data, or an inappropriate study design (32), but more likely to a too rapid exchangeability between particles (33).

Due to the number of patients, we were not able to confirm the inverse associations found previously between plasma apoM and catabolic rates of HDL-apoA-I in 60 patients with hypertriglyceridemia (17). As mentioned earlier, TG play a central role on plasma apoM, but also on HDL-apoA-I catabolism (34), and it is unclear if this correlation remains when adjusted on TG. The lack of association we have observed could also suggest that apoM and apoA-I behaved differently through the HDL degradation and clearance. It is still not known if they remained together on the particles with the action of the hepatic lipase and the cholesterol exchange through the scavenger receptor class B type I (SR-B1).

We confirmed that plasma apoM could be catabolized through LDL particles as previously reported (18), although LDL did not constitute its main carrier (1, 3, 18). As HDL-apoM pool size is much bigger than those of LDL-apoM, we hypothesized the HDL, as well as the NLR compartment, act as reservoirs for apoM, assuming a fast recycling and exchangeability between them until apoM clearance through LDL. We were not able to confirm the impact of LDL catabolic rate on the total plasma apoM concentration (18), probably again because of the number of patients, but we found a significant and positive association for catabolic rates of plasma and LDL apoM with LDL-apoB100.

Besides, production rates of apoM in plasma, NLR and LDL compartments, as well as LDL-apoM concentrations, were associated with PCSK9 plasma levels, a natural inhibitor of LDL receptor (35). All together, these data support the key role of the LDL receptor in the disappearance of plasma apoM. In sharp difference with the HDL, it is likely that the strong affinity of apoM with the LDL explained their joined clearance. Noteworthy, our kinetic data are not comparable with those recently reported on HDL-apoM on three subjects (16). We found lower catabolic or production rates as well as lower pool sizes. We have only enrolled men while two of the three subjects analyzed in the other study were women. It was shown that estrogens increased the synthesis of apoM (36) and sex differences are likely but deserve additional studies. TG are another candidates to explain such a difference as they appeared to increase the rate of LDL-apoM production by improving the exchanges of apoM between compartments.

Finally, S1P is a signaling sphingolipid regulating pro- and anti-atherogenic processes, and increased plasma S1P concentrations could protect against atherosclerosis and related diseases (37). However, it remains difficult to clearly settle on the role of S1P within lipoproteins as distinct pools of plasma S1P exist (i.e. HDL-S1P vs albumin-S1P) with different physiological roles (11). We confirmed that circulating S1P increased in association with plasma TG as previously reported (29), and showed that elevated plasma S1P is related to apoM production rates in plasma and both LDL and NLR compartments, while no association was found with HDL-apoM kinetics. We have also identified a novel plasma pool of S1P in the plasma, which is not related to lipoproteins or plasma albumin, but to unbound apoM. Again, this novel plasma pool of S1P seemed to be sharply associated with plasma TG. The contribution of S1P to apoM fluxes between lipoprotein particles or to the apoM clearance via the LDL pathway is difficult to dissect out from our data. Kinetic studies of apoM and S1P plasma distribution in patients with extreme phenotypes (from identified mutations, e.g. familial hypercholesterolemia) or under specific treatments acting with different mechanisms (e.g. statins, fibrates, nicotinic acid) could be useful to gain further knowledges.

In conclusion, we were able to investigate apoM kinetics in lipoprotein fractions using novel mass spectrometry-based methods. We also showed that plasma TG could play a central role in both apoM and S1P distribution between lipoprotein classes, and our results underlined the key role of LDL kinetics in apoM turnover. Hence, our results pave the way for further investigations, which are required to clearly settle the role of apoM in atherosclerosis prevention.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Biogenouest CORSAIRE core facility for their financial support. The authors thank the staff of the Clinical Investigation Center of the University Hospital in Nantes, especially Yassine Zair and Eliane Hiverneau for their invaluable helps with patients and blood collection.

## REFERENCES

1. Xu N, Dahlbäck B. A novel human apolipoprotein (apoM). *J Biol Chem*. 1999. 29;274(44):31286-90.
2. Christoffersen C, Nielsen LB, Axler O, Andersson A, Johnsen AH, Dahlbäck B. Isolation and characterization of human apolipoprotein M-containing lipoproteins. *J Lipid Res*. 2006. 47(8):1833-43.
3. Ren K, Tang ZL, Jiang Y, Tan YM, Yi GH. Apolipoprotein M. *Clin Chim Acta*. 2015. 446:21-9.
4. Elsøe S, Christoffersen C, Luchoomun J, Turner S, Nielsen LB. Apolipoprotein M promotes mobilization of cellular cholesterol in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 2013. 1831(7):1287-92.
5. Christoffersen C, Jauhiainen M, Moser M, Porse B, Ehnholm C, Boesl M, Dahlbäck B, Nielsen LB. Effect of apolipoprotein M on high density lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knock-out mice. *J Biol Chem*. 2008. 283(4):1839-47.
6. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med*. 2005. 11(4):418-22.
7. Elsøe S, Ahnström J, Christoffersen C, Hoofnagle AN, Plomgaard P, Heinecke JW, Binder CJ, Björkbacka H, Dahlbäck B, Nielsen LB. Apolipoprotein M binds oxidized phospholipids and increases the antioxidant effect of HDL. *Atherosclerosis*. 2012. 221(1):91-7.
8. Zhang XY, Dong X, Zheng L, Luo GH, Liu YH, Ekström U, Nilsson-Ehle P, Ye Q, Xu N. Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization. *Acta Histochem*. 2003. 105(1):67-72.
9. Faber K, Axler O, Dahlbäck B, Nielsen LB. Characterization of apoM in normal and genetically modified mice. *J Lipid Res*. 2004. 45(7):1272-8.
10. Axler O, Ahnström J, Dahlbäck B. An ELISA for apolipoprotein M reveals a strong correlation to total cholesterol in human plasma. *J Lipid Res*. 2007. 48(8):1772-80.
11. Pyne S, Adams DR, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: Recent advances. *Prog Lipid Res*. 2016; 62:93-106.
12. Borup A, Christensen PM, Nielsen LB, Christoffersen C. Apolipoprotein M in lipid metabolism and cardiometabolic diseases. *Curr Opin Lipidol*. 2015. 26(1):48-55.
13. Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J Lipid Res*. 2006. 47(8):1607-19.
14. Pan Y, Zhou H, Mahsut A, Rohm RJ, Berejnaia O, Price O, Chen Y, Castro-Perez J, Lassman ME, McLaren D, Conway J, Jensen KK, Thomas T, Reyes-Soffer G, Ginsberg HN, Gutstein DE, Cleary M, Previs SF, Roddy TP. Static and turnover kinetic measurement of protein biomarkers involved in triglyceride metabolism including apoB48 and apoA5 by LC/MS/MS. *J Lipid Res*. 2014. 55(6):1179-87.
15. Croyal M, Fall F, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Zaïr Y, Ouguerram K, Krempf M, Nobécourt E. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J Lipid Res*. 2016. 57(3):509-15.
16. Singh SA, Andraski AB, Pieper B, Goh W, Mendivil CO, Sacks FM, Aikawa M. Multiple apolipoprotein kinetics measured in human HDL by high-resolution/accurate mass parallel reaction monitoring. *J Lipid Res*. 2016. 57(4):714-28.
17. Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Nielsen LB, Plomgaard P, Dahlbäck B, Barrett PH. Association of apolipoprotein M with high-density lipoprotein kinetics in overweight-obese men. *Atherosclerosis*. 2010. 210(1):326-30.
18. Christoffersen C, Benn M, Christensen PM, Gordts PL, Roebroek AJ, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Dahlbäck B, Nielsen LB. The plasma concentration of HDL-associated apoM is

- influenced by LDL receptor-mediated clearance of apoB-containing particles. *J Lipid Res.* 2012. 53(10):2198-204.
19. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955. 34(9):1345-53.
20. Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, Boileau C, Magot T, Krempf M. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004. 24(8):1448-53.
21. Chétiveaux M, Nazih H, Ferchaud-Roucher V, Lambert G, Zaïr Y, Masson M, Ouguerram K, Bouhours D, Krempf M. The differential apoA-I enrichment of prebeta1 and alphaHDL is detectable by gel filtration separation. *J Lipid Res.* 2002. 43(11):1986-93.
22. Croyal et al. *Diabetes and Metabolism*, 2017.
23. Tavori H, Christian D, Minnier J, Plubell D, Shapiro MD, Yeang C, Giunzioni I, Croyal M, Duell PB, Lambert G, Tsimikas S, Fazio S. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ Res.* 2016. 119(1):29-35.
24. Croyal M, Ouguerram K, Passard M, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Billon-Crossouard S, de Gouville AC, Lambert G, Krempf M, Nobécourt E. Effects of Extended-Release Nicotinic Acid on Apolipoprotein (a) Kinetics in Hypertriglyceridemic Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015. 35(9):2042-7.
25. Frénais R, Ouguerram K, Maugeais C, Mahot P, Maugère P, Krempf M, Magot T. High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia.* 1997. 40(5):578-83.
26. Maugeais C, Ouguerram K, Krempf M, Maugeais P, Gardette J, Bigot E, Magot T. A minimal model using stable isotopes to study the metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. *Diabetes Metab.* 1996. 22(1):57-63.
27. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003. 13(11):2498-504.
28. Nielsen LB, Christoffersen C, Ahnström J, Dahlbäck B. ApoM: gene regulation and effects on HDL metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2009. 20(2):66-71.
29. Kowalski GM, Carey AL, Selathurai A, Kingwell BA, Bruce CR. Plasma sphingosine-1-phosphate is elevated in obesity. *PLoS One.* 2013. 8(9):e72449.
30. Karuna R, Park R, Othman A, Holleboom AG, Motazacker MM, Sutter I, Kuivenhoven JA, Rohrer L, Matile H, Hornemann T, Stoffel M, Rentsch KM, von Eckardstein A. Plasma levels of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M in patients with monogenic disorders of HDL metabolism. *Atherosclerosis.* 2011. 219(2):855-63.
31. Fleming JK, Glass TR, Lackie SJ, Wojciak JM. A novel approach for measuring sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid binding to carrier proteins using monoclonal antibodies and the Kinetic Exclusion Assay. *J Lipid Res.* 2016. 57(9):1737-47.
32. Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J Lipid Res.* 2006, 47(8):1607-19.
33. Ooi EM, Chan DT, Watts GF, Chan DC, Ng TW, Dogra GK, Irish AB, Barrett PH. Plasma apolipoprotein C-III metabolism in patients with chronic kidney disease. *J Lipid Res.* 2011, 52(4):794-800.
34. Frénais R, Nazih H, Ouguerram K, Maugeais C, Zaïr Y, Bard JM, Charbonnel B, Magot T, Krempf M. In vivo evidence for the role of lipoprotein lipase activity in the regulation of apolipoprotein AI metabolism: a kinetic study in control subjects and patients with type II diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001. 86(5):1962-7.

- 35.** Marais DA, Blom DJ, Petrides F, Gouëffic Y, Lambert G. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition. *Curr Opin Lipidol.* 2012. 23(6):511-7.
- 36.** Wei J, Shi Y, Zhang X, Feng Y, Luo G, Zhang J, Mu Q, Tang Y, Yu Y, Pan L, Nilsson-Ehle P, Xu N. Estrogen upregulates hepatic apolipoprotein M expression via the estrogen receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2011. 1811(12):1146-51.
- 37.** Soltau I, Mudersbach E, Geissen M, Schwedhelm E, Winkler MS, Geffken M, Peine S, Schoen G, Debus ES, Larena-Avellaneda A, Daum G. Serum-Sphingosine-1-Phosphate Concentrations Are Inversely Associated with Atherosclerotic Diseases in Humans. *PLoS One.* 2016. 11(12):e0168302.

**FIGURE CAPTIONS**

**Figure 1 – Association of apolipoprotein M (apoM) and sphingosine-1-phosphate (S1P).** Spearman associations between S1P and apoM (A) in plasma, (B) in HDL, (C) in LDL and (D) in non-lipoprotein related (NLR) fractions.

**Figure 2 – Associations of biochemical parameters.** Correlation network obtained between biochemical parameters in plasma compartments. Only positive associations having r coefficients greater than 0.5 are presented.

**Figure 3 – Kinetics of targeted apolipoproteins.** Mean  $\pm$  SEM kinetic curves obtained over the course of the tracer infusion for all targeted apolipoproteins. M3:  $^2\text{H}_3$ -Leucine labeled peptide, M0: unlabeled peptide,  $\delta$ : baseline subtracted.

**Figure 4 – Association of apolipoprotein M (apoM) production rates (PR) and PCSK9 plasma concentrations.** Spearman associations between PCSK9 and apoM PR (A) in plasma, (B) in HDL, (C) in LDL and (D) in non-lipoprotein related (NLR) fractions.

**Table 1** - Concentrations of S1P, apoM and others lipid related data of the subjects in whole plasma and lipoproteins. Mean (range) expressed in mg/dL otherwise specified.

	<b>Plasma</b>	<b>HDL</b>	<b>VLDL</b>	<b>LDL</b>
S1P (nmol/L)	269.0 (122.3-396.4)	98.0 (48.9-148.9)	Not detected	21.0 (4.3-39.6)
apoM	2.7 (1.7-4.5)	1.6 (0.8-2.5)	Not detected	0.10 (0.02-0.19)
apoA-I	136.3 (99.3-180.0)	123.4 (110.0-171.1)	Not assayed	Not assayed
apoA-II	34.9 (22.5-66.5)	17.7 (9.7-26.5)	Not assayed	Not assayed
apoB100	88.5 (50.1-140.2)	Not assayed	8.1 (0.3-17.1)	63.3 (36.1-107.6)
apoC-II	2.7 (1.7-3.7)	1.3 (0.1-2.5)	1.4 (0.1-2.5)	Not detected
apoC-III	15.3 (3.7-28.1)	4.0 (0.3-7.8)	9.4 (0.8-19.2)	Not detected
apoE	5.6 (1.6-9.0)	1.9 (0.3-4.2)	1.9 (0.4-5.3)	Not detected
PCSK9 (ng/mL)	224.9 (131.9-373.9)	Not assayed	Not assayed	Not assayed
Triglycerides	158.7 (47.0-340.0)	4.9 (0.4-15.0)	77.0 (4.8-187.0)	7.2 (0.5-18.7)
Cholesterol	193.7 (125.0-276.1)	46.3 (26.9-65.9)	25.3 (7.7-51.3)	113.0 (63.1-185.2)

S1P, sphingosine-1-phosphate; HDL, high-density lipoprotein; VLDL, very low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9.

**Table 2** - Kinetic parameters of apolipoproteins (mean  $\pm$  SEM, n = 14).

<b>Parameters</b>	<b>Pool sizes (mg)</b>	<b>FCR (pool/d)</b>	<b>PR (mg/kg/d)</b>
Plasma apoM	105.3 $\pm$ 12.7	0.712 $\pm$ 0.049	0.892 $\pm$ 0.103
NLR-apoM	41.6 $\pm$ 10.6	0.314 $\pm$ 0.051	0.192 $\pm$ 0.059
HDL-apoM	59.6 $\pm$ 6.7	0.275 $\pm$ 0.024	0.188 $\pm$ 0.16
LDL-apoM	4.1 $\pm$ 0.8	0.219 $\pm$ 0.013	0.010 $\pm$ 0.002
LDL-apoB100	2,304.2 $\pm$ 224.5	0.344 $\pm$ 0.037	9.54 $\pm$ 1.32
HDL-apoA-I	4,596.9 $\pm$ 362.6	0.278 $\pm$ 0.015	15.35 $\pm$ 0.85
HDL-apoA-II	1,331.0 $\pm$ 181.3	0.283 $\pm$ 0.035	4.56 $\pm$ 0.74

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NLR, non-lipoprotein related; FCR, fractional catabolic rate; PR, production rate.

**Table 3** – Spearman associations obtained for plasma apoM kinetic parameters with lipoprotein kinetics (r coefficients, brackets indicate p values).

Parameters	Plasma apoM kinetic parameters	
	FCR	PR
LDL-apoB100 FCR	0.68 (0.010)	NS
LDL-apoB100 PR	NS	NS
HDL-apoA-I FCR	NS	NS
HDL-apoA-I PR	NS	NS
HDL-apoA-II FCR	NS	NS
HDL-apoA-II PR	NS	NS
HDL-apoM FCR	NS	NS
HDL-apoM PR	NS	NS
LDL-apoM FCR	0.54 (0.048)	NS
LDL-apoM PR	NS	0.78 (0.001)
NLR-apoM FCR	0.56 (0.041)	0.55 (0.045)
NLR-apoM PR	0.68 (0.009)	0.81 (<0.001)

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; FCR, fractional catabolic rate; PR, production rate; NS, not significant (p >0.05).

Figure 1

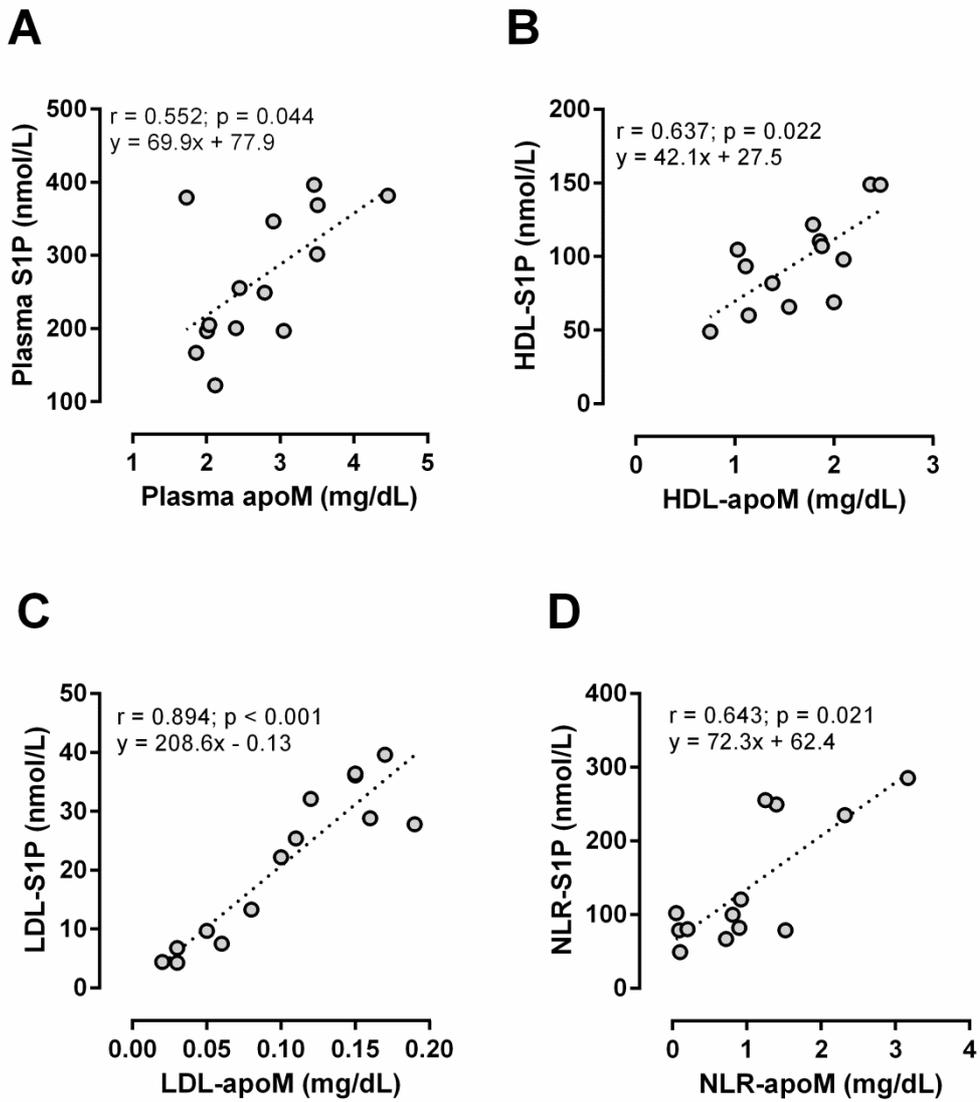


Figure 2

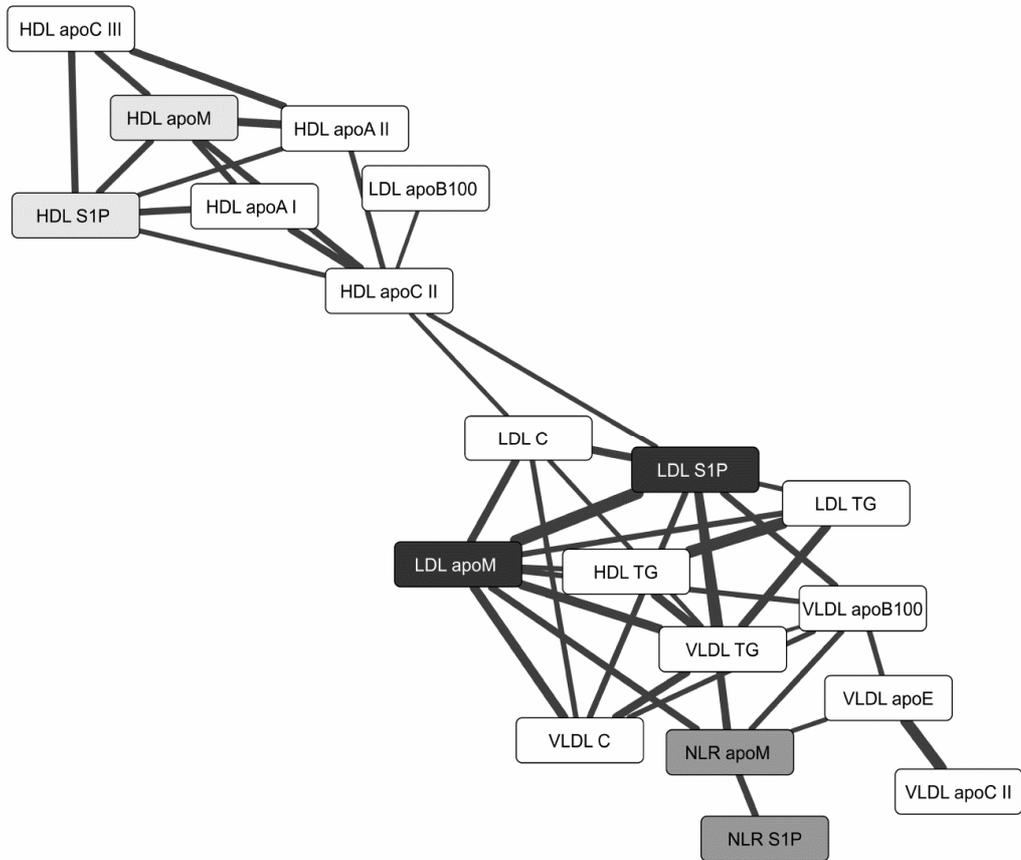


Figure 3

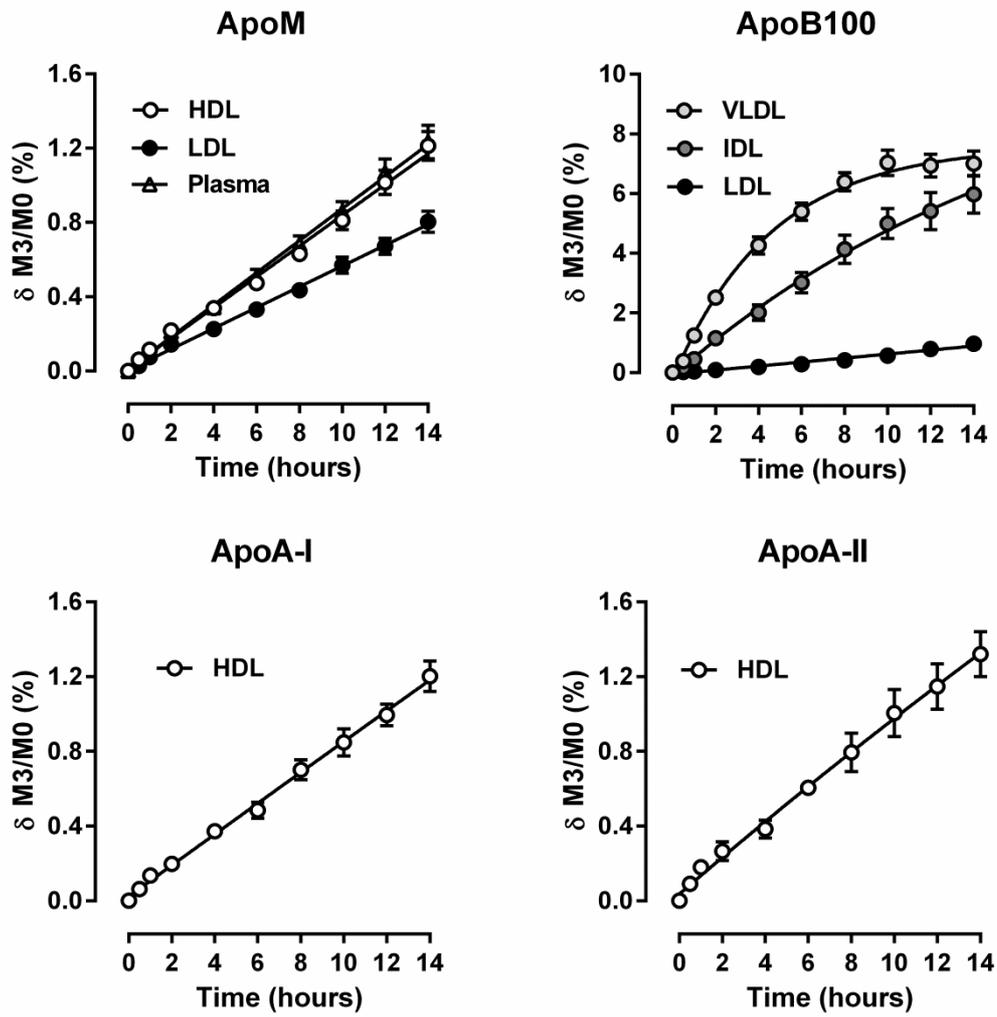
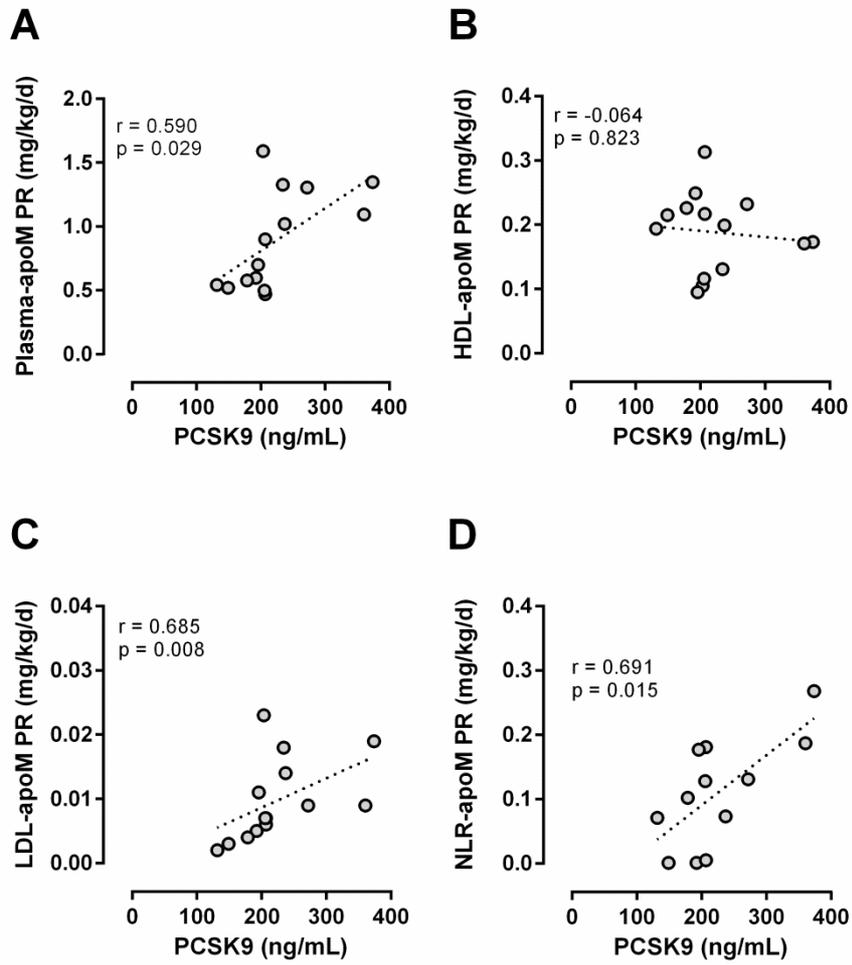


Figure 4



## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Table S1 - Analytical parameters selected for apolipoprotein detection.

Apolipoprotein		Peptide sequence	Fragment	Cone/collision (V)	MRM transition ( <i>m/z</i> )	RT (min)
ApoA-I 28,079 Da	M0	ATEHLSTLSEK	$y_{10}^{2+}$	25/15 V	406.2 → 573.2	1.4 ± 0.1
	M3	ATEHL <u>STL</u> SEK			407.2 → 574.7	
	IS	ATEHLSTLSEK			408.9 → 577.2	
ApoA-II 17,416 Da	M0	SPELQAEAK	$y_6^+$	30/30 V	486.8 → 659.3	1.5 ± 0.1
	M3	SPE <u>L</u> QAEAK			488.3 → 662.3	
	IS	SPELQAEAK			490.3 → 667.3	
ApoB100 512,858 Da	M0	NLQNNAEWVYQGAI <b>R</b>	$y_6^+$	30/17 V	593.1 → 707.4	2.6 ± 0.1
	M3	N <u>L</u> QNNAEWVYQGAI <b>R</b>			594.1 → 707.4	
	IS	NLQNNAEWVYQGAI <b>R</b>			596.4 → 717.4	
ApoC-II 8,204 Da	M0	TAAQNLYEK	$y_7^+$	35/20 V	519.7 → 865.7	1.6 ± 0.1
	IS	TAAQNLYE <b>K</b>			523.7 → 873.7	
ApoC-III 8,765 Da	M0	DALSSVQESQVAQQAR	$y_8^+$	40/35 V	858.9 → 887.5	2.2 ± 0.1
	IS	DALSSVQESQVAQQ <b>A</b> R			863.4 → 897.5	
ApoE 34,237 Da	M0	LGPLVEQGR	$y_5^+$	25/30 V	484.8 → 588.3	2.4 ± 0.1
	IS	LGPLVEQ <b>G</b> R			489.3 → 598.3	
ApoM 21,253 Da	M0	AFL <b>L</b> TPR	$y_5^+$	30/10 V	409.3 → 599.5	2.6 ± 0.1
	M3	A <u>FLL</u> TPR			410.8 → 602.5	
	IS	AFL <b>L</b> TPR			414.3 → 609.5	

M0, unlabeled peptide; M3, labeled peptide; IS, internal standard; MRM, multiple reaction monitoring; RT, retention time. Underlined L indicates the putative incorporation site(s) of  $^2\text{H}_3$ -leucine. Bold indicates the labeled amino acid [ $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_2$ ]-K or [ $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$ ]-R.

**Supplemental Table S2** - Spearman correlation matrix obtained between S1P and apoM in all compartments (colored cells for  $p < 0.05$ ; in grey, positive associations; in black, negative associations; na: not applicable).

Parameters	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Plasma apoM (1)	1	na											
Plasma S1P (2)	2		na										
Plasma S1P/apoM (3)	3			na									
NLR-apoM (4)	4				na								
NLR-S1P (5)	5					na							
NLR S1P/apoM (6)	6						na						
HDL-apoM (7)	7							na					
HDL-S1P (8)	8								na				
HDL S1P/apoM (9)	9									na			
LDL-apoM (10)	10										na		
LDL-S1P (11)	11											na	
LDL S1P/apoM (12)	12												na

**Supplemental Table S3** - Spearman correlation matrix obtained for lipids and apolipoproteins in all compartments.

Parameters	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Plasma apoA-I (1)	na																										
Plasma apoA-II (2)		na																									
Plasma apoB100 (3)			na																								
Plasma apoC-II (4)				na																							
Plasma apoC-III (5)					na																						
Plasma apoC-II/C-III (6)						na																					
Plasma apoE (7)							na																				
Plasma PCSK9 (8)								na																			
Plasma CT (9)									na																		
Non-HDL-C (10)										na																	
Plasma TG (11)											na																
HDL-apoA-I (12)												na															
HDL-apoA-II (13)													na														
HDL-apoC-II (14)														na													
HDL-apoC-III (15)															na												
HDL-apoE (16)																na											
HDL-C (17)																	na										
HDL-TG (18)																		na									
VLDL-apoB100 (19)																			na								
VLDL-apoC-II (20)																				na							
VLDL-apoC-III (21)																					na						
VLDL-apoE (22)																						na					
VLDL-TG (23)																							na				
VLDL-C (24)																								na			
LDL-apoB100 (25)																									na		
LDL-C (26)																										na	
LDL-TG (27)																											na

**Supplemental Table S4** - Spearman correlations obtained between apoM and all lipid parameters (r coefficients, brackets indicate p values). Results that were no significant (p >0.05) in the 4 compartments were not presented.

Parameters	Plasma apoM	HDL-apoM	LDL-apoM	NLR-apoM
Plasma apoA-II	0.640 (0.016)	NS	NS	0.555 (0.042)
Plasma apoB100	NS	NS	0.800 (0.001)	0.691 (0.008)
Plasma apoC-II	0.785 (0.001)	NS	0.804 (0.001)	0.781 (0.002)
Plasma apoC-III	0.851 (<0.001)	NS	0.839 (<0.001)	0.816 (0.001)
Plasma apoE	NS	NS	0.590 (0.029)	0.676 (0.010)
Plasma PCSK9	NS	NS	0.701 (0.007)	0.558 (0.040)
Plasma cholesterol	NS	NS	0.705 (0.006)	0.559 (0.040)
Non-HDL cholesterol	0.552 (0.044)	NS	0.826 (0.001)	0.673 (0.010)
Plasma triglyceride	0.560 (0.040)	NS	0.641 (0.016)	0.711 (0.006)
HDL-apoA-I	NS	0.620 (0.021)	NS	NS
HDL-apoA-II	NS	0.741 (0.003)	NS	NS
HDL-apoC-II	NS	NS	0.539 (0.049)	NS
HDL-apoC-III	NS	0.587 (0.030)	NS	NS
HDL-apoE	NS	NS	NS	-0.645 (0.015)
HDL triglyceride	NS	NS	0.610 (0.023)	NS
VLDL-apoB100	NS	NS	0.551 (0.044)	0.623 (0.020)
VLDL triglyceride	NS	NS	0.797 (0.001)	NS
VLDL cholesterol	0.587 (0.030)	NS	0.716 (0.005)	0.550 (0.044)
LDL cholesterol	NS	NS	0.680 (0.009)	NS
LDL triglyceride	NS	NS	0.696 (0.007)	NS

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; VLDL, very low-density lipoprotein; NLR, non-lipoprotein related; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. NS: not significant (p >0.05).

**Supplemental Table S5** - Spearman correlations obtained between S1P and all lipid parameters (r coefficients, brackets indicate p values). Results that were no significant (p >0.05) in the 4 compartments were not presented.

Parameters	Plasma S1P	HDL-S1P	LDL-S1P	NLR-S1P
Plasma apoA-II	NS	NS	0.714 (0.005)	NS
Plasma apoB100	NS	NS	0.771 (0.002)	NS
Plasma apoC-II	NS	NS	0.930 (<0.001)	NS
Plasma apoC-III	0.723 (0.005)	NS	0.873 (<0.001)	0.657 (0.013)
Plasma apoE	NS	NS	0.666 (0.011)	NS
Plasma PCSK9	0.669 (0.011)	NS	0.733 (0.004)	0.634 (0.017)
Plasma cholesterol	NS	NS	0.648 (0.014)	NS
Non-HDL cholesterol	NS	NS	0.789 (0.001)	NS
Plasma triglyceride	0.837 (<0.001)	NS	0.657 (0.013)	0.846 (<0.001)
HDL-apoA-I	NS	0.726 (0.005)	NS	NS
HDL-apoA-II	NS	0.552 (0.044)	NS	NS
HDL-apoC-II	NS	NS	0.570 (0.036)	NS
HDL-apoC-III	NS	0.648 (0.014)	NS	NS
HDL-apoE	-0.700 (0.007)	NS	NS	-0.726 (0.004)
HDL triglyceride	0.719 (0.005)	NS	NS	0.723 (0.005)
VLDL-apoB100	NS	NS	0.591 (0.029)	NS
VLDL-apoE	0.572 (0.035)	NS	NS	0.594 (0.028)
VLDL triglyceride	0.547 (0.046)	NS	0.736 (0.004)	NS
VLDL cholesterol	NS	NS	0.596 (0.027)	NS
LDL-apoB100	NS	NS	NS	-0.574 (0.035)
LDL cholesterol	NS	NS	0.616 (0.021)	NS
LDL triglyceride	0.706 (0.006)	NS	0.600 (0.026)	0.688 (0.008)

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; VLDL, very low-density lipoprotein; NLR, non-lipoprotein related; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; S1P, sphingosine-1-phosphate. NS: not significant (p >0.05).

**Supplemental Table S6** – Spearman correlations obtained for production rates of apoM in all compartments with lipid parameters (r coefficients, brackets indicate p values).

Parameters	Production rates			
	Plasma apoM	NLR apoM	HDL apoM	LDL apoM
Plasma apoA-I	NS	NS	NS	NS
Plasma apoA-II	0.57 (0.035)	NS	NS	NS
Plasma apoB100	NS	0.62 (0.020)	NS	0.81 (<0.001)
Plasma apoC-II	0.69 (0.008)	0.65 (0.014)	NS	0.82 (<0.001)
Plasma apoC-III	0.77 (0.002)	0.69 (0.008)	NS	0.90 (<0.001)
Plasma apoE	NS	NS	NS	0.58 (0.031)
Plasma S1P	0.56 (0.040)	0.65 (0.014)	NS	0.70 (0.007)
Plasma Cholesterol	NS	NS	NS	0.69 (0.008)
Non-HDL Cholesterol	NS	0.59 (0.028)	NS	0.81 (<0.001)
Plasma triglycerides	NS	0.62 (0.020)	-0.076 (0.002)	0.73 (0.004)
NLR-S1P	NS	0.58 (0.029)	NS	0.60 (0.027)
HDL-apoA-I	NS	NS	NS	NS
HDL-apoA-II	NS	NS	0.62 (0.021)	NS
HDL-apoC-II	NS	NS	NS	NS
HDL-apoC-III	NS	NS	NS	NS
HDL-apoE	NS	-0.61 (0.021)	0.77 (0.002)	-0.62 (0.020)
HDL-S1P	NS	NS	0.54 (0.048)	NS
HDL cholesterol	NS	NS	NS	NS
VLDL-apoB100	NS	NS	NS	NS
VLDL-apoC-II	NS	NS	NS	NS
VLDL-apoC-III	NS	NS	NS	NS
VLDL-apoE	NS	NS	NS	NS
LDL-S1P	0.73 (0.004)	0.73 (0.005)	NS	0.92 (<0.001)
LDL-apoB100	NS	NS	NS	NS
LDL cholesterol	NS	NS	NS	0.61 (0.024)

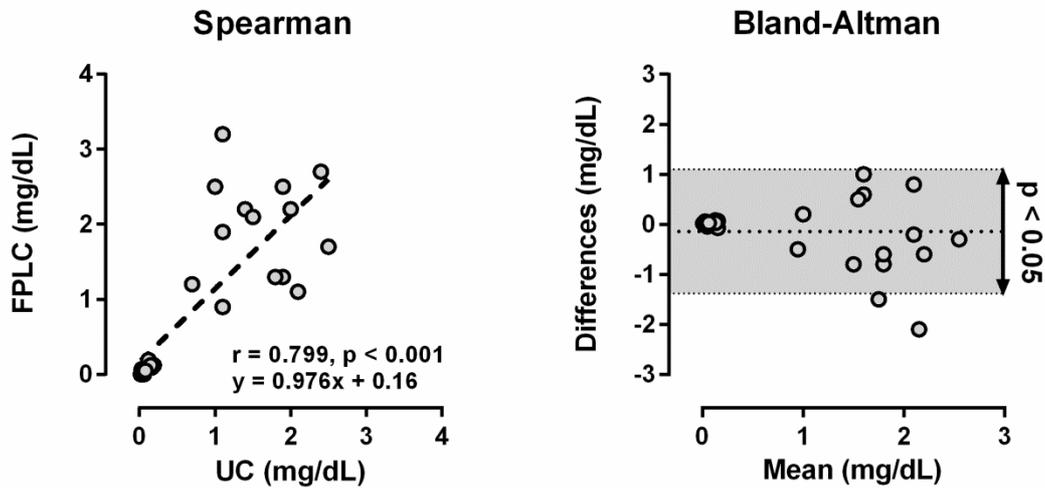
HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; VLDL, very low-density lipoprotein; NLR, non-lipoprotein related. NS: not significant (p >0.05).

**Supplemental Table S7** - Spearman correlations obtained for concentrations of S1P and apoM in all compartments with lipoprotein kinetic parameters (r coefficients, brackets indicate p values).

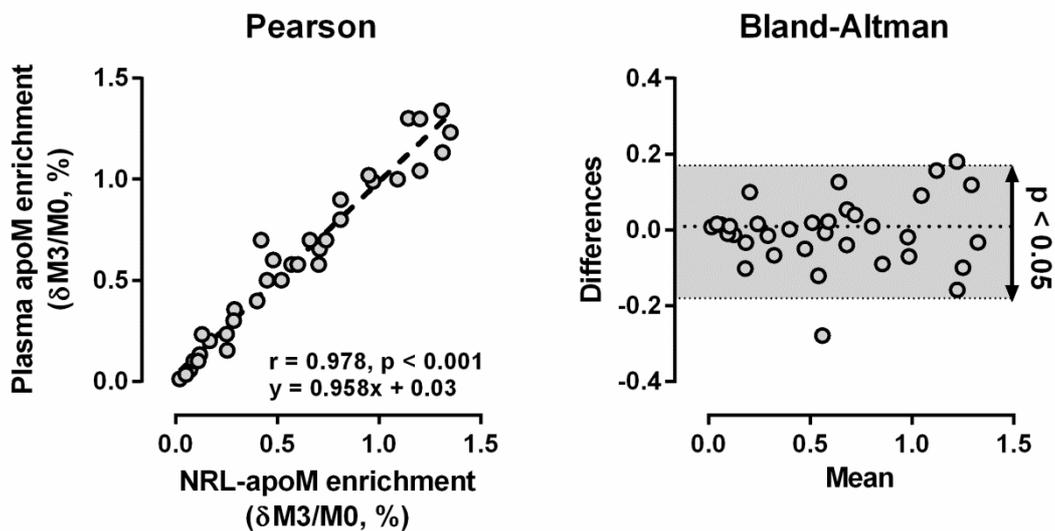
Parameters	ApoM				S1P			
	Plasma	NLR	HDL	LDL	Plasma	NLR	HDL	LDL
<b>LDL-apoB100 FCR</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>LDL-apoB100 PR</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>HDL-apoA-I FCR</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>HDL-apoA-I PR</b>	NS	NS	0.62 (0.020)	NS	NS	NS	NS	NS
<b>HDL-apoA-II FCR</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>HDL-apoA-II PR</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Plasma apoM FCR</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Plasma apoM PR</b>	0.89 (<0.001)	0.76 (0.002)	NS	0.70 (0.007)	0.56 (0.040)	NS	NS	0.73 (0.004)
<b>NLR-apoM FCR</b>	NS	0.60 (0.027)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>NLR-apoM PR</b>	0.64 (0.015)	0.95 (<0.001)	NS	0.58 (0.033)	0.65 (0.014)	0.59 (0.029)	NS	0.73 (0.004)
<b>HDL-apoM FCR</b>	-0.64 (0.015)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>HDL-apoM PR</b>	NS	-0.69 (0.008)	0.55 (0.044)	NS	NS	NS	0.54 (0.048)	NS
<b>LDL-apoM FCR</b>	NS	NS	-0.54 (0.049)	NS	NS	NS	NS	NS
<b>LDL-apoM PR</b>	0.77 (0.002)	0.85 (<0.001)	NS	0.96 (<0.001)	0.70 (0.007)	0.60 (0.027)	NS	0.92 (<0.001)

FCR, fractional catabolic rate; PR, production rate; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NLR, non-lipoprotein related; S1P, sphingosine-1-phosphate. NS: not significant (p >0.05).

**Supplemental Figure S1** - Spearman correlation obtained between FPLC and ultracentrifugation (UC) for apoM recovering in lipoprotein fractions (HDL and LDL), and comparison of both methods using the Bland-Altman test (mean of paired results versus their differences).



**Supplemental Figure S2** - Pearson correlation obtained between apoM enrichments measured in the total plasma and in the NLR fraction (ultracentrifugation, bottom fraction), and comparison of paired data using the Bland-Altman test (mean of paired results versus their differences). Samples were arbitrarily selected ( $n = 36$ ) at all kinetic time points.



## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les modèles à plusieurs compartiments sont très informatifs mais requièrent l'acquisition préalable d'un grand nombre d'information (Barrett *et al.* 2006). Après revue de la littérature, nous avons pu établir que l'apoM est reliée à divers paramètres lipidiques (S1P, cholestérol, triglycérides...) et lipoprotéiques (cinétiques HDL et LDL). En outre, l'apoM est majoritairement synthétisée par le foie et le rein, rapidement liée aux HDL après sécrétion dans la circulation, puis délivrée aux lipoprotéines à apoB, notamment en présence de niveaux élevés de triglycérides et de cholestérol (Christoffersen *et al.* 2012 ; Ren *et al.* 2015).

Au regard de ces informations, nous avons conclu qu'il était nécessaire d'étudier, en parallèle de l'apoM, les cinétiques HDL et VLD/IDL/LDL. Nous avons également estimé qu'il était important de mesurer les enrichissements de l'apoM dans le plasma total, les HDL et les lipoprotéines à apoB100 (absence de CM dans notre cas). L'application de notre méthode multiplexe nous a permis d'accéder très rapidement à ces informations, auxquelles nous avons ajouté le dosage d'apolipoprotéines fortement associées au métabolisme des triglycérides (apoE, apoC-II et apoC-III). Nous avons également mis en place un dosage rapide et efficace de la S1P par LC-MS/MS afin d'étudier ses relations avec l'apoM.

Nos premiers résultats nous ont montré que l'apoM et la S1P étaient quantifiables dans la plupart des fractions plasmatiques (plasma, HDL, LDL) à l'exception des VLDL et IDL. Nous avons ainsi rapidement observé que les deux composés n'étaient pas totalement récupérés dans ces fractions lipoprotéiques. Ceci était prévisible pour la S1P (Pyne *et al.* 2016) mais non attendu pour l'apoM. Du fait de l'éventuelle échangeabilité de l'apoM entre les différentes classes de lipoprotéines, nous avons choisi de vérifier si ce phénomène n'était pas imputable à la méthode d'isolement par ultracentrifugation, à l'instar des apoC-III et apoE (Batal *et al.* 2000). Nous avons donc comparé nos rendements avec ceux obtenus à l'aide d'une méthode plus douce : la filtration sur gel (FPLC). Les deux approches ayant donné des résultats similaires, nous avons conclu que ce phénomène était probablement d'ordre physiologique. Dès lors, il nous est apparu essentiel de mesurer les enrichissements de l'apoM dans cette fraction plasmatique non-lipoprotéique. Notre première approche (basée sur l'aspect global des courbes obtenues dans le plasma, les HDL et les LDL) nous a conduits à penser que les enrichissements de la fraction non-lipoprotéique devaient être très proches de ceux mesurés dans le plasma. Cette hypothèse s'est avérée juste à en juger par la comparaison des enrichissements mesurés dans le plasma et les culots récupérés après ultracentrifugations

séquentielles. Néanmoins, nous ne pouvons pas totalement exclure un décrochage de l'apoM lors de ce procédé, même si ce dernier amène aux mêmes résultats que la FPLC. L'emploi de l'immuno-affinité pour l'isolement spécifique des lipoprotéines à apoA-I (HDL) et apoB100 (VLDL/IDL/LDL) pourrait nous permettre de clairement statuer sur ce point.

L'avantage majeur des avancées méthodologiques et technologiques est l'obtention d'un maximum de données en un temps très court. En revanche, leur analyse et leur interprétation deviennent souvent plus difficiles. Des matrices de corrélations ont donc été construites afin de sortir de notre jeu de données la substance nécessaire à la création d'un modèle cinétique à plusieurs compartiments. Malgré cela, nous n'avons pas été en mesure de développer et de valider un tel modèle, commun à tous les patients, et capable d'associer les enrichissements obtenus dans chaque compartiment plasmatique tout en tenant compte de leurs tailles respectives (pools). En dépit de très bons ajustements des courbes d'enrichissement, il ne nous a pas été possible d'allier précision et équilibre des flux massiques. Ceci est probablement lié au fait que l'apoM est très rapidement échangée entre les différents compartiments, comme cela a été précédemment décrit pour l'apoC-III (Ooi *et al.* 2011). C'est d'ailleurs principalement la parfaite superposition des courbes VLDL- et HDL-apoC-III, tout comme ici les courbes NLR- et HDL-apoM, qui avait permis aux auteurs d'arriver à cette conclusion. Nous avons donc opté pour des modélisations simples mono-compartimentales. Nos résultats montrent que l'apoM est probablement liée aux HDL après sécrétion, puis échangée aux LDL pour y être catabolisée. Nous avons également constaté que le compartiment non-lipoprotéique pourrait agir comme « réservoir » d'apoM avant son recyclage par les HDL et/ou son épuration par les LDL.

Probablement à cause du nombre de patients inclus dans cette étude ( $n = 14$ ), nous n'avons pas été en mesure de confirmer les associations préalablement démontrées entre les concentrations plasmatiques d'apoM et les cinétiques HDL ( $n = 60$ , Ooi *et al.*) et/ou l'activité du récepteur aux LDL ( $n = 45$ , Christoffersen *et al.* 2012). En revanche, nos résultats abondent dans le sens d'une épuration de l'apoM via les LDL, que nous allons tenter de vérifier chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (mutation du récepteur aux LDL). Malgré l'absence de description des échanges en lipoprotéines, nos résultats ont permis de mettre en évidence l'importance de la fraction non-lipoprotéique, elle-même fortement associée aux profils athérogènes (dans notre cas, triglycérides élevés). Sans apporter de mécanisme cinétique particulier, de précédents travaux ont suggéré que le différentiel de concentrations circulantes en HDL ( $\sim 20 \mu\text{M}$ ) et LDL ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) pourraient justifier la faible

abondance d'apoM dans les LDL, et qu'une diminution de ce différentiel (abaissement des HDL) favoriserait l'échange de l'apoM vers les LDL (Karuna *et al.* 2011 ; Christoffersen *et al.* 2012). De plus, il a été montré récemment que l'apoM a une affinité beaucoup plus forte pour les LDL que pour les HDL (Fleming *et al.* 2016). Nos résultats abondent en ce sens.

Enfin, nous avons pu confirmer les fortes associations entre la S1P et l'apoM. L'action de la S1P demeure néanmoins difficile à interpréter étant donné qu'elle présente des propriétés à la fois pro- et anti-athérogènes suivant sa localisation (lipoprotéines, cellules, plasma...). L'étude de ses propres flux pourrait apporter de nouveaux éclairages quant à son action. Malheureusement, le traceur utilisé lors de notre étude ( $^2\text{H}_3$ -Leucine) ne permet pas l'obtention de ces informations. L'utilisation d'un traceur plus universel ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) ou plus spécifique ( $^{13}\text{C}_{16}$ -palmitate) pourrait palier à ce problème. Néanmoins, la complexité des données qui pourrait en découler nécessite de développer des approches de modélisations complexes, qui nous conduiront à nous rapprocher d'autres centres experts (équipe des Professeurs G. Watts et H. Barrett, The University of Western Australia, Perth, Australie).



**DISCUSSION GENERALE**  
**ET CONCLUSION**



## **DISCUSSION GÉNÉRALE**

L'analyse cinétique des composants lipoprotéiques est réalisée essentiellement *via* l'utilisation de traceurs enrichis en isotopes stables. Ces analyses permettent de mettre en évidence les dérèglements engendrés par une pathologie, d'approfondir les connaissances des mécanismes biologiques sous-jacents et d'évaluer l'efficacité d'une intervention thérapeutique. A cause de la complexité de ces études, il est souvent nécessaire de caractériser au préalable les composés ciblés afin d'utiliser les traceurs adéquats dans les conditions physiologiques requises. Les analyses quantitatives et/ou les mesures d'empreintes métaboliques, en amont de ces études, présentent donc un grand intérêt. En outre, les évolutions instrumentales et techniques constantes font qu'il est désormais possible d'obtenir rapidement un large éventail de données. L'objectif de ce travail a donc été de développer des méthodes analytiques originales basées sur la spectrométrie de masse afin de caractériser de façon statique et dynamique les principaux constituants des lipoprotéines plasmatiques humaines. En conséquence, ces travaux ont pu être découpés selon trois axes : 1) développements méthodologiques pour l'analyse des protéines, 2) développements méthodologiques pour l'analyse des lipides, et 3) application de ces outils à des études de cas concrets. Ce dernier chapitre a pour but d'établir un état des lieux de ce qui a été réalisé en réponse à ces objectifs, de ce qui est actuellement en cours de réalisation et des perspectives qui en découlent.

### **DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES POUR L'ANALYSE DES PROTEINES**

Le développement des méthodes analytiques pour l'analyse quantitative, cinétique et polymorphique des protéines est sans conteste le point central des travaux présentés ici. La mise en place du protocole expérimental a nécessité de longues semaines d'ajustements et reste en constante évolution. Son principe, tel que validé aujourd'hui, réside dans l'hydrolyse enzymatique contrôlée d'un mélange complexe de protéines d'intérêts, impossibles à analyser simultanément à l'aide des méthodes courantes de la bioanalyse, de la biochimie et de la biologie moléculaire. Cette hydrolyse génère un ensemble de peptides dont il est possible de choisir un ou plusieurs candidats spécifiques de la ou des protéines ciblées. Ces peptides constituent une classe de molécules très adaptée à l'analyse par chromatographie liquide (phase inverse) couplée à la spectrométrie de masse en tandem basse résolution (LC-MS/MS)

utilisant l'électrospray comme source d'ionisation, soit l'un des outils les plus courants des plateformes de spectrométrie de masse (triple quadripole, piège à ions...). A noter que l'élément central de cette approche réside dans le choix du peptide signature qui doit être adapté à la question biologique posée (enrichissement, polymorphisme, concentration). Au fur et à mesure des projets, nous avons pu établir une méthode multiplexe robuste permettant les analyses suivantes :

- Quantification en plasma/sérum/fractions lipoprotéiques : apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoA-V (difficilement), apoB48 (difficilement), apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE (isoformes E2, E3 et E4), apoM, apo(a), PCSK9 (difficilement), LCAT, CETP, PLTP et adiponectine.
- Polymorphisme en plasma/sérum/fractions lipoprotéiques : glycosylation de l'apoC-III (apoC-III<sub>0</sub>, apoC-III<sub>1</sub>, apoC-III<sub>2</sub>), taille médiane de l'apo(a) (répétition du Kringle IV<sub>2</sub>) et phénotype quantitatif apoE2, apoE3 et apoE4.
- Enrichissements en <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine en plasma/sérum : apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE (apoE2, apoE3 et apoE4), apoM, apo(a) (si concentrations supérieures à 150 nmol/L).
- Enrichissements en <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine en fractions lipoprotéiques : apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoB48 (difficile), apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE (apoE2, apoE3 et apoE4), apoM, apo(a) (si concentrations supérieures à 30 nmol/L).

Aujourd'hui, il est possible de quantifier la plupart des protéines citées ci-dessus bien que certaines d'entre elles restent difficilement détectables (apoA-V, PCSK9 et apoB48), du fait des faibles concentrations circulantes (< à 20 nmol/L), ou tout simplement à cause des propriétés physico-chimiques des peptides marqueurs. En conséquence, il nous est encore impossible d'étudier plus en détails ces protéines d'un point de vue cinétique à l'exception de l'apoB48 que l'on peut concentrer et isoler par ultracentrifugations (chylomicrons). D'autres protéines, majoritairement circulantes (LCAT, CETP, PLTP et adiponectine), sont quantifiables mais insuffisamment concentrées pour l'étude des enrichissements. Enfin, pour ces mêmes raisons, l'étude approfondie du polymorphisme de certaines d'entre elles demeure impossible par spectrométrie de masse.

Ce protocole expérimental permet d'utiliser entre 10 et 70 µL de prise d'essai (30 µL en routine) sans altération de son efficacité. Dans certains cas, le simple fait d'augmenter le volume d'échantillon dans la limite des 70 µL permet de contourner les limitations évoquées

précédemment. Dans le cas des fractions lipoprotéiques isolées par ultracentrifugations, les volumes importants générés (1-2 mL à partir de 3 mL de plasma) sont faciles à concentrer en amont par simple filtration, permettant ainsi de gagner jusqu'à un facteur 20 en sensibilité (cas des apoB48, apoB100, apo(a) et CETP) sans pour autant concentrer les interférents présents dans la matrice déjà éliminés lors de l'isolement. Ceci n'est malheureusement pas possible pour les protéines non liées aux lipoprotéines. Dès lors, nous avons entrepris de développer des méthodes spécifiques d'immunocapture en amont de notre protocole d'hydrolyse enzymatique. Le principe consiste à greffer un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt sur un support adéquat (billes magnétiques). Les billes greffées sont ensuite ajoutées à l'échantillon dont le volume peut être plus important (250-500  $\mu$ L). Après incubation et plusieurs étapes de lavage, il est ensuite possible d'isoler les billes greffées ayant capté la protéine d'intérêt dans un petit volume de tampon physiologique (50  $\mu$ L) dépourvu des interférents matriciels. Il est alors possible de réaliser notre protocole initial sur ce complexe billes-anticorps-antigène à l'instar des fractions lipoprotéiques concentrées par filtration.

En collaboration avec la plateforme de protéines recombinantes de Nantes (INSERM U892), nous développons actuellement ce procédé pour PCSK9 afin de mesurer les enrichissements de cette dernière, et nos premiers résultats sont très prometteurs (gain actuel en sensibilité  $\times 20$ ). Cette méthode sera également utilisée afin de caractériser quantitativement les différentes isoformes de PCSK9 dans le cas de mutations établies lui conférant un gain ou une perte de fonctionnalité, à l'instar de l'apoE (isoformes E2, E3 et E4). En outre, PCSK9 est normalement présente sous deux isoformes circulantes : l'une dite mature et active, et une seconde, clivée *via* un site furine, dite non active. La difficulté de l'analyse de ces deux isoformes réside dans le fait que le clivage endogène de PCSK9 est identique à celui généré dans le protocole *in vitro* *via* la trypsine. Après mise en place de notre protocole d'immuno-capture, l'utilisation d'une autre protéase sera donc nécessaire (remplacement de la trypsine par un combiné Lys-C+Glu-C, ou par la chymotrypsine). L'utilisation de nouvelles endoprotéases fait d'ailleurs, d'une façon plus générale, l'objet de toute notre attention de par la possibilité de générer de nouveaux peptides signatures plus significatifs dans la caractérisation polymorphique de certaines protéines.

Enfin, ce procédé d'immuno-capture sera testé pour la mesure des enrichissements d'autres protéines cibles telles que l'apoA-V (synthèse rapide, excellent pool précurseur), l'apoB48 (utile dans le cas d'études postprandiales, pool précurseur) et l'apo(a) dans le cas de patients présentant des concentrations circulantes très faibles ( $< 30$  nmol/L). L'objectif final sera de

combiner les techniques d'immunocapture afin de faciliter les étapes expérimentales. Pour le cas particulier de l'apo(a), le développement d'une méthode d'isolement spécifique de ses deux isoformes circulantes en amont de l'analyse par LC-MS/MS fait également l'objet d'une attention particulière.

### DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES POUR L'ANALYSE DES LIPIDES

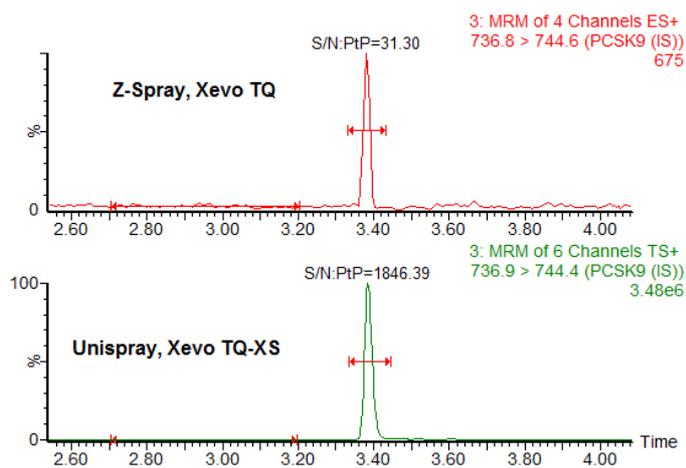
Le développement de méthodes analytiques quantitatives « à façon » pour l'analyse des lipides, et à base de chromatographie en phases gazeuse, liquide ou supercritique couplées à la spectrométrie de masse haute ou basse résolution, ne constitue pas aujourd'hui un enjeu majeur. En effet, un grand nombre de méthodes ciblées sont déjà disponibles dans la littérature (Löfgren *et al.* 2012 ; Zhou *et al.* 2014 ; Wei *et al.* 2015 ; Della Corte *et al.* 2015 ; Han 2016). Depuis le début de mon activité professionnelle en 2003, j'ai été amené à développer de nombreuses méthodes spécifiques pour la quantification de composés exogènes (xénobiotiques) et endogènes (acides aminés, amines biogènes, stéroïdes...) de bas poids moléculaires. Dans ce domaine, le véritable apport de cette thèse au laboratoire a été la mise en place d'une méthode non-ciblée permettant la mesure d'empreintes lipidiques à l'aide d'un système haute résolution (Q-TOF). J'ai pu ainsi utiliser différents outils qui m'étaient jusqu'alors inconnus tels que la MS<sup>E</sup> et la mobilité ionique. A l'aide de cet équipement, nous avons été en mesure de constituer une base de données solide indexant près de 200 espèces moléculaires lipidiques clairement identifiées et caractérisées en termes de structures. Néanmoins, lors des études non-ciblées, l'extraction des données génère plusieurs milliers de variables qu'il est encore difficile d'analyser dans leur ensemble. L'exploitation de ces résultats se fait majoritairement après sélection des variables identifiées comme étant l'un des 200 marqueurs préalablement caractérisés. L'analyse multivariée des jeux de données « omiques » fait donc partie des prochains objectifs de notre équipe avec le soutien de MetaboHub et du « Workflow 4 Metabolomics ».

Concernant les mesures cinétiques des lipides, trois approches distinctes peuvent être discutées. La première consiste à établir, à partir des traceurs couramment employés au sein du laboratoire (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-acétate), dans quelle mesure la cartographie isotopologique inter-compartimentale (ou entre tissus) pourrait permettre d'expliquer diverses altérations du métabolisme des lipides. Cette approche nécessite uniquement le passage à d'autres techniques d'analyses (LC-HRMS, LC-MS/MS, GC-MS) que celle couramment utilisée

jusqu'alors (GC-C-IRMS), comme discuté dans l'article 6. La seconde consiste à étendre le spectre des analyses cinétiques à d'autres espèces moléculaires lipidiques que le cholestérol, telles que les sphingolipides et les acylglycérols. Cette approche peut être envisagée à partir de techniques analytiques nouvelles (LC-HRMS, LC-MS/MS, GC-MS) ou usuelles (GC-C-IRMS) avec le concours des traceurs couramment employés ou de nouveaux plus ou moins spécifiques ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}_{16}$ -palmitate ou  $^{13}\text{C}_{18}$ -oleate). Enfin, la troisième consiste à combiner les mesures d'empreintes lipidiques aux mesures d'enrichissements isotopiques afin de détecter de façon non-ciblée l'impact d'un traceur sur une ou plusieurs espèces lipidiques. De façon plus utopiste, l'étude isotopologique environnementale (c'est-à-dire l'abondance naturelle des isotopes en fonction de l'environnement) sur les altérations métaboliques pourrait découler de ce dernier axe (notion d'isotopomique).

### VERS LES EVOLUTIONS TECHNOLOGIQUES

Les enjeux méthodologiques énoncés précédemment nécessitent le recours à des idées originales afin de contourner les limites associées aux outils analytiques. Néanmoins, force est de constater que les évolutions technologiques vont de pair avec les préoccupations des chercheurs et les nouveaux défis qu'ils se posent. Ainsi, il y a quelques années, il était difficile d'analyser de façon ciblée plus de 10 composés en simultané, alors qu'aujourd'hui il est possible d'en suivre plusieurs dizaines avec une meilleure sensibilité et en un temps d'analyse beaucoup plus court. De même, les résolutions des systèmes n'ont cessé de s'accroître, rendant les identifications et caractérisations structurales des composés inconnus plus fiables. Nous avons pu tester le dernier système triple quadripôle développé par la société Waters, ce qui m'a permis de constater l'état des évolutions technologiques sur ce type d'appareillage. Cette évolution est illustrée par la Figure ci-dessus où le peptide marqueur de PCSK9 a été utilisé à titre d'exemple. Il s'agit du même échantillon injecté sur notre système (Xevo TQ, 2011) puis sur le nouveau (Xevo TQ-XS, 2016). Les conditions chromatographiques utilisées étaient identiques (même colonne,



même phases mobiles, même gradient), seules les transitions MRM ont été ajustées à l'appareil. Ainsi, en 5 ans, un gain en sensibilité considérable a été obtenu pour ce type de composé ( $\times 60$ , confirmé pour 4 autres peptides).

#### VERS DE NOUVELLES METHODES DE MARQUAGE ISOTOPIQUE

Les traceurs utilisés au sein du laboratoire sont particulièrement bien adaptés et ont fait leurs preuves pour les études cinétiques des protéines ( $^2\text{H}_3$ -leucine) et de certains lipides tels que le cholestérol ( $^{13}\text{C}_2$ -acétate).

Cependant, après plusieurs essais conduits par LC-HRMS et LC-MS/MS, le  $^{13}\text{C}_2$ -acétate s'est avéré peu adapté aux cinétiques de plusieurs espèces lipidiques telles que les triglycérides, les sphingolipides et les phospholipides. Ceci est probablement la conséquence d'un faible niveau d'enrichissement pour ces composés, lui-même dilué par divers états isotopologiques difficiles à déterminer sur ces molécules complexes. Nous allons néanmoins essayer de mesurer par GC-C-IRMS, technique plus robuste dans ce domaine, l'enrichissement  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  au sein d'un acide gras majoritaire (l'acide palmitique) extrait par hydrolyse de différentes classes de lipides branchés (acylglycérols, phospholipides), préalablement séparées par extraction en phases solide/liquide. Ce test aura pour principal objectif d'étendre le spectre de nos analyses GC-C-IRMS à d'autres espèces lipidiques que le cholestérol. Sur ces mêmes échantillons, la mesure de la répartition isotopologique pourra être réalisée par GC-MS afin de décrire, à titre informatif, les niveaux d'enrichissements optimums inhérents aux différentes familles de lipides ciblées.

D'autres types de traceurs plus spécifiques des lipides, comme le  $^{13}\text{C}_{16}$ -palmitate, présentent un intérêt certain pour le suivi d'une chaîne de réactions enzymatiques à l'origine de la synthèse de lipides complexes tels que les sphingolipides, les acylglycérols ou les phospholipides. Ces études pourraient être conduites *in vitro* sur cellules ou fractions subcellulaires (fraction S9, microsomes), voire *in vivo* chez le rongeur. L'avantage de ce type de traceur est le décalage en masse apporté par le niveau de marquage, rendant leur suivi plus facile et reproductible par les techniques LC-HRMS et LC-MS/MS. Ce type d'outils permettrait également de suivre plus spécifiquement diverses réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme des lipides.

Enfin, notre projet principal en ce qui concerne le marquage isotopique réside dans l'emploi de nouveaux traceurs ubiquitaires tels que l'eau marquée ( $^2\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) (Castro-Perez *et al.* 2011 ; Schierbeek *et al.* 2012 ; Zhou *et al.* 2012 ; Conway *et al.* 2012 ; Wilkinson *et al.* 2014 ; Previs *et al.* 2014). Les premières expériences pourraient être conduites *in vitro* (sur cellules) ou *in vivo* chez l'animal (souris, rats). Ce type de traceur devrait permettre un marquage universel de toutes les espèces moléculaires telles que les protéines, les lipides mais également tout autre métabolite. Le laboratoire est aujourd'hui doté d'une large gamme de méthodes de dosage ciblé pour les molécules de bas poids moléculaires (céramides, sphingomyélines, acides aminés, amines biogènes, sels biliaires, stérols...) pleinement compatibles avec ce type d'analyse. Il en est de même pour la méthode d'analyse des protéines ainsi que pour la méthode lipidomique. Le défi principal résidera dans le choix de l'isotopologue à analyser pour chaque espèce moléculaire, qu'il s'agisse d'un métabolite, d'un lipide ou d'un peptide. L'analyse de la distribution des isotopologues sera dès lors déterminante, tout comme la mise en place des conditions opératoires et d'analyse des données générées. En outre, l'apprentissage des outils de modélisation sera déterminant afin d'exploiter le plus précisément possible ces données.

#### ANALYSE DES DONNEES A GRANDE ECHELLE

Le développement de méthodes analytiques, toujours plus performantes, entraîne la production d'un nombre très important de données statiques. Il s'agit d'un enjeu majeur des sciences « omiques ». L'étude de la relevance et de la significativité d'une variable parmi les autres implique l'utilisation d'outils adaptés capable d'ingérer un flux de données important. Les compétences nécessaires à ce type d'analyses sont aujourd'hui proposées par l'infrastructure MetaboHub qui va intervenir en soutien d'un programme de recherche hospitalo-universitaire (RHU Chopin) de métabolomique et de lipidomique, piloté par le laboratoire sur les aspects analytiques. Le but principal sera de développer une parfaite autonomie dans la gestion de ces données dans le cadre de cette collaboration.

De la même manière, l'utilisation d'outils analytiques permettant d'évaluer les cinétiques d'enrichissement de plusieurs molécules en simultané, ainsi que l'intégration de nouveaux traceurs universels, conduit à la genèse d'un jeu de données important qu'il peut être difficile d'interpréter. Au-delà d'une optimisation de l'utilisation des logiciels de modélisation couramment utilisés (SAAM II par exemple), il faut envisager la mise en place de

collaborations ou de programmes de recherche probablement collaboratifs pour les analyses très complexes de ces vastes matrices de données. Ce point est actuellement en cours de discussion avec l'un des laboratoires de référence en ce domaine (équipe des Professeurs G. Watts et H. Barrett, The University of Western Australia, Perth, Australie).

### **APPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES**

D'un point de vu physiologique et fonctionnel, certains marqueurs protéiques phares des pathologies cardiovasculaires, comme l'apo(a) et PCSK9, nécessiteront une attention toute particulière. En effet, afin d'accroître notre niveau de connaissance sur ces protéines clés, l'intégration d'outils courants de la biologie moléculaire en amont des analyses LC-MS/MS est actuellement en cours. Ainsi, les procédés d'immuno-capture permettront de purifier et de concentrer ces protéines pour une analyse plus fine et plus sensible (enrichissements). L'utilisation de nouvelles endoprotéases, seules ou en combinaison, permettra de rechercher de nouveaux peptides signatures appropriés pour l'étude de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation...) ou génétiques à l'origine de certains troubles pathologiques. L'utilisation de techniques séparatives complémentaires (électrophorèse, filtration sur gel...) pour isoler les isoformes circulantes de l'apo(a) permettra également de mieux comprendre les mécanismes d'action régissant son métabolisme, toujours sujet à controverse.

Le développement de nouvelles méthodes analytiques, de nouveaux outils d'analyse et de nouveaux procédés opératoires vise avant tout à répondre aux questions biologiques. Les techniques mises en place permettront ainsi de mieux caractériser des échantillons complexes dans différents cas physiopathologiques. L'emploi de méthodologies permettant les mesures d'empreintes et la quantification multiple et simultanée de divers paramètres protéiques et métaboliques conduira à une meilleure appréciation des systèmes d'étude à l'échelle plasmatique et tissulaire. Il sera alors possible d'intégrer de nouveaux traceurs ou d'effectuer des marquages multiples afin de suivre de façon dynamique les différents paramètres modulés par un état physiopathologique, quelle que soit leur identité moléculaire. L'acquisition des compétences nécessaires à l'analyse et l'interprétation des nombreuses données générées se fera en partie par la mise en place de solides collaborations de recherche. Le projet apoM et S1P (**article 7**) est une illustration préliminaire de ce que le laboratoire souhaite réaliser à l'avenir ; l'intégration globale des dynamiques entre lipides et protéines. Pour ce projet, les

cinétiques propres de la S1P auraient d'ailleurs été très utiles à la compréhension des associations ligand-transporteur-lipoprotéines.

## **CONCLUSION**

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis d'élargir le champ des analyses réalisées jusqu'alors au laboratoire pour l'étude statique et dynamique des lipoprotéines. Concernant les lipides et autres métabolites, plusieurs méthodes quantitatives par GC-MS et LC-MS/MS ont été développées permettant le criblage de nombreuses molécules de bas poids moléculaire impliquées dans le risque cardiovasculaire. En outre, les mesures d'empreintes lipidiques globales par LC-HRMS ont permis d'appréhender sans a priori de nouvelles fenêtres d'investigation qu'il nous sera encore possible d'élargir par l'acquisition des compétences nécessaires au traitement de ces données. La mise en place d'un criblage des apolipoprotéines par LC-MS/MS, tant statique que cinétique, a également conduit à un surcroît d'information de grande utilité dans la compréhension globale des dérèglements physiopathologiques associés au métabolisme des lipoprotéines. Les données acquises jusqu'alors vont permettre de mieux appréhender les outils d'analyses cinétiques, notamment dans le cadre de modèles complexes multi-compartimentés. Enfin, le développement de techniques biochimiques de pointe, pour une meilleure caractérisation moléculaire de certaines espèces protéiques impliquées dans le métabolisme des lipides, conduira à une meilleure compréhension des perturbations physiologiques associées au risque cardiovasculaire.

L'ensemble de ces techniques analytiques amène d'ores et déjà à réfléchir quant à l'évolution des protocoles de marquage en amont des analyses biochimiques. Fort de l'expérience acquise ou en cours d'apprentissage dans la gestion des données statiques comme dynamiques, l'utilisation de nouveaux traceurs isotopiques, tels que l'eau marquée, attire toute l'attention du laboratoire. La mise en place de ces nouveaux procédés de marquage nécessitera un développement rigoureux en amont (rongeur, cellules) afin de mieux maîtriser les contraintes liées à ces évolutions avant leur utilisation chez l'homme. L'analyse et la modélisation des données est un enjeu tout aussi important qui va nécessiter un développement et des collaborations spécifiques. L'utilisation des nouvelles méthodes développées lors de ces travaux de thèse permettra d'appréhender cette transition, à l'instar du bouleversement technologique entraîné par l'utilisation des isotopes stables au début des années 1990.



# REFERENCES



## REFERENCES

### -A-

- Abbatiello SE, Schilling B, Mani DR, Zimmerman LJ, Hall SC, MacLean B, Albertolle M, Allen S, Burgess M, Cusack MP, Gosh M, Hedrick V, Held JM, Inerowicz HD, et al. Large-Scale Interlaboratory Study to Develop, Analytically Validate and Apply Highly Multiplexed, Quantitative Peptide Assays to Measure Cancer-Relevant Proteins in Plasma. *Mol Cell Proteomics*, **2015**, 14: 2357-2374.
- Abumrad NA, and Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev*, **2012**, 92: 1061-1085.
- Ahnstrom J, Faber K, Axler O, and Dahlback B. Hydrophobic ligand binding properties of the human lipocalin apolipoprotein M. *J Lipid Res*, **2007**, 48: 1754-1762.
- Alonso R, Mata P, Muniz O, Fuentes-Jimenez F, Diaz LJ, Zambon D, Tomas M, Moyon T, Croyal M, Thedrez A, and Lambert G. Plasma PCSK9 and Lipoprotein (a) levels are two predictors of coronary artery calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **2016**, 254: 249-253.
- Andrikoula M, and McDowell IFW. The contribution of apoB and apoA1 measurements to cardiovascular risk assessment. *Diabetes Obes Metab*, **2008**, 10: 271-278.

### -B-

- Bailhache E, Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, and Ouguerram K. Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest*, **2004**, 34: 527-534.
- Barrett PHR, Parhofer KG, Bier D, and Schonfeld G. Postmenopausal estrogen and the metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med*, **1992**, 326: 954-955.
- Barrett PHR and Foster DM. Kinetic analysis of lipoprotein metabolism. In *Lipoproteins in Health and Disease*. DJ Betteridge, DR Illingworth, and J Shepherd (ed). Arnold, London, **1998**, 523-529.
- Barrett PH, Bell BM, Cobelli C, Golde H, Schumitzky A, Vicini P, and Foster DM. SAAM II: Simulation, Analysis, and Modeling Software for tracer and pharmacokinetic studies. *Metabolism*, **1998**, 47: 484-492.
- Barrett PHR, Chan DC, and Watts GF. Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J Lipid Res*, **2006**, 47: 1607-1619.
- Batal R, Tremblay M, Barrett PH, Jacques H, Fredenrich A, Mamer O, Davignon J, and Cohn JS. Plasma kinetics of apoC-III and apoE in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *J Lipid Res*, **2000**, 41: 706-718.
- Beghin L, Duhal N, Poulain P, Hauw P, Lacroix B, Lecerf JM, Bonte JP, Fruchart JC, and Luc G. Measurement of apolipoprotein B concentration in plasma lipoproteins by combining selective precipitation and mass spectrometry. *J Lipid Res*, **2000**, 41: 1172-1176.

- Beltz WF, Kesäniemi YA, Howard BV, and Grundy SM. Development of an integrated model for analysis of the kinetics of apolipoprotein B in plasma very low density lipoproteins, intermediate density lipoproteins, and low density lipoproteins. *J Clin Invest*, **1985**, 76: 575-585.
- Berry SEE. Postprandial lipaemia – the influence of diet and its link to coronary heart disease. *Nutr Bull*, **2005**, 30: 314-322.
- Bilheimer DW, Eisenberg S, and Levy RI. The metabolism of VLDL protein-preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biophys Acta*, **1972**, 260: 212-221.
- Bird SS, Marur VR, Stavrovskaya IG, and Kristal BS. Qualitative Characterization of the Rat Liver Mitochondrial Lipidome using LC-MS Profiling and High Energy Collisional Dissociation (HCD) All Ion Fragmentation. *Metabolomics*, **2013**, 9: 67-83.
- Birjmohun RS, Dallinga-Thie GM, Kuivenhoven JA, Stroes ES, Otvos JD, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJ, Khaw KT, and Boekholdt SM. Apolipoprotein A-II is inversely associated with risk of future coronary artery disease. *Circulation*, **2007**, 116: 2029-2035.
- Bismuth J, Lin P, Yao Q, and Chen C. Ceramide: a common pathway for atherosclerosis? *Atherosclerosis*, **2008**, 196: 497-504.
- Bleakney W. A New Method of Positive Ray Analysis and Its Application to the Measurement of Ionization Potentials in Mercury Vapor. *Phys.Rev*, **1929**, 34: 157.
- Bligh ED, and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, **1959**, 37:911-917.
- Boesl U. Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. *Mass Spectrom Rev*, **2017**, 36: 86-109.
- Boisfer E, Lambert G, Atger V, Tran NQ, Pastier D, Benetollo C, Trottier JF, Beaucamps I, Antonucci M, Laplaud M, Griglio S, Chambaz J, and Kalopissis AD. Overexpression of human apolipoprotein A-II in mice induces hypertriglyceridemia due to defective very low density lipoprotein hydrolysis. *J Biol Chem*, **1999**, 274: 11564-11572.
- Boon J, Hoy AJ, Stark R, Brown RD, Meex RC, Henstridge DC, Schenk S, Meikle PJ, Horowitz JF, Kingwell BA, Bruce CR, and Watt MJ. Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes*, **2013**, 62: 401-410.
- Borup A, Christensen PM, Nielsen LB, and Christoffersen C. Apolipoprotein M in lipid metabolism and cardiometabolic diseases. *Curr Opin Lipidol*, **2015**, 26: 48-55.
- Brewer HB Jr. Current concepts of the molecular structure and metabolism of human apolipoproteins and lipoproteins. *Klin Wochenschr*, **1981**, 59: 1023-1035.
- Bruckert E, and Hansel B. HDL-C is a powerful lipid predictor of cardiovascular diseases. *Int J Clin Pract*, **2007**, 61: 1905-1913.
- Brunengraber H, Kelleher JK, and Des Rosiers C. Applications of mass isotopomer analysis to nutrition research. *Annu Rev Nutr*, **1997**, 17: 559-596.
- Byrdwell WC. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*, **2001**, 36:327-346.

## -C-

- Campana JE. Elementary theory of the quadrupole mass filter. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **1980**, 33: 101-117.
- Castro-Perez JM, Roddy TP, Shah V, McLaren DG, Wang SP, Jensen K, Vreeken RJ, Hankemeier T, Johns DG, Previs SF, and Hubbard BK. Identifying static and kinetic lipid phenotypes by high resolution UPLC-MS: unraveling diet-induced changes in lipid homeostasis by coupling metabolomics and fluxomics. *J Proteome Res*, **2011**, 10: 4281-4290.
- Ceglarek U, Dittrich J, Becker S, Baumann F, Kortz L, and Thiery J. Quantification of seven apolipoproteins in human plasma by proteotypic peptides using fast LC-MS/MS. *Proteomics Clin Appl*, **2013**, 7: 794-801.
- Chan DC, Watts GF, Barrett PHR, Beili LJ, Redgrave TG, and Mori TA. Regulatory effects of HMGCoA reductase inhibitor and fish oils on apolipoprotein B100 kinetics in insulin resistant obese male subjects with dyslipidaemia. *Diabetes*, **2002**, 51: 2377-2386.
- Chan DC, Chen MM, Ooi EMM, and Watts GF. An ABC of apolipoprotein C-III: a clinically useful new cardiovascular risk factor? *Int J Clin Pract*, **2008**, 62: 799-809.
- Cheng JM, Suoniemi M, Kardys I, Vihervaara T, de Boer SP, Akkerhuis KM, Sysi-Aho M, Ekroos K, Garcia-Garcia HM, Oemrawsingh RM, Regar E, Koenig W, Serruys PW, van Geuns RJ, Boersma E, and Laaksonen R. Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis*, **2015**, 243: 560-566.
- Chétiveaux M, Ouguerram K, Zair Y, Maugère P, Falconi I, Nazih H, and Krempf M. New model for kinetic studies of HDL metabolism in humans. *Eur J Clin Invest*, **2004**, 34: 262-267.
- Cheung MC, and Albers JJ. Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *J Lipid Res*, **1982**, 23: 747-753.
- Chivot L, Mainard F, Bigot E, Bard JM, Auget JL, Madec Y, and Fruchart JC. Logistic discriminant analysis of lipids and apolipoproteins in a population of coronary bypass patients and the significance of apolipoproteins C-III and E. *Atherosclerosis*, **1990**, 82: 205-211.
- Christoffersen C, Benn M, Christensen PM, Gordts PL, Roebroek AJ, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Dahlbäck B, and Nielsen LB. The plasma concentration of HDL-associated apoM is influenced by LDL receptor-mediated clearance of apoB-containing particles. *J Lipid Res*, **2012**, 53: 2198-2204.
- Chroni A, Nieland TJ, Kypreos KE, Krieger M, and Zannis VI. SR-BI mediates cholesterol efflux via its interactions with lipid-bound ApoE. Structural mutations in SR-BI diminish cholesterol efflux. *Biochemistry*, **2005**, 44:13132-13143.
- Cobelli C, Lepschy A, and Romanin Jacur G. Identifiability of compartmental systems and related structural properties. *Math Biosci*, **1979**, 44: 1-18.
- Conway JP, Johns DG, Wang SP, Walker ND, McAvoy TA, Zhou H, Zhao X, Previs SF, Roddy TP, Hubbard BK, Yates NA, and Hendrickson RC. Measuring H(2)(18)O tracer incorporation on a QQQ-MS platform provides a rapid, transferable screening tool for relative protein synthesis. *J Proteome Res*, **2012**, 11: 1591-1597.

- Crown SB, and Antoniewicz MR. Publishing  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis studies: a review and future perspectives. *Metab Eng*, **2013**, 20: 42-48.
- Croyal M, Dauvilliers Y, Labeeuw O, Capet M, Schwartz JC, and Robert P. Histamine and tele-methylhistamine quantification in cerebrospinal fluid from narcoleptic subjects by liquid chromatography tandem mass spectrometry with precolumn derivatization. *Anal Biochem*, **2011**, 409: 28-36.
- Cryer DR, Matsushima T, Marsh JB, and Cortner JA. Direct measurement of apolipoprotein B synthesis in human very low density lipoprotein using stable isotopes and mass spectrometry. *J Lipid Res*, **1985**, 27: 508-516.

### -D-

- Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, Kastelein JJ, Péterfy M, and Nieuwdorp M. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis*. **2010**, 211: 1-8.
- Danik JS, Rifai N, Buring JE, and Ridker PM. Lipoprotein (a), measured with an assay independent of apolipoprotein (a) isoform size, and risk of future cardiovascular events among initially healthy women. *JAMA*, **2006**, 296: 1363-1370.
- Della Corte A, Chitarrini G, Di Gangi IM, Masuero D, Soini E, Mattivi F, and Vrhovsek U. A rapid LC-MS/MS method for quantitative profiling of fatty acids, sterols, glycerolipids, glycerophospholipids and sphingolipids in grapes. *Talanta*, **2015**, 140: 52-61.
- Dominiczak MH. Apoproteins and lipoproteins in human plasma. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. *Handbook of Lipoprotein Testing*. 2nd edn. Washington DC: AACC Press, **2000**: 1-29.
- Dominiczak MH, and Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem*, **2011**, 48: 498-515.
- Dubreuil P. Introduction à la spectrométrie de masse. [www.rocler.qc.ca/pdubreuil/masse](http://www.rocler.qc.ca/pdubreuil/masse)
- Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, and Goodacre R. HUSERMET Consortium. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*, **2011**, 6: 1060-1083.

### -E-

- Enkhmaa B, Abbuthalha A, Anuurad E, Zhang W, Tarantal AF, and Berglund L. Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) lipoprotein(a) and apolipoprotein(a): high frequency of small size apolipoprotein(a) isoforms. *J Med Primatol*, **2015**, 44: 117-124.

### -F-

- Farnier M. PCSK9: From discovery to therapeutic applications. *Arch Cardiovasc Dis*, **2014**, 107: 58-66.

- Federherr E, Willach S, Roos N, Lange L, Molt K, and Schmidt TC. A novel high-temperature combustion interface for compound-specific stable isotope analysis of carbon and nitrogen via high-performance liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2016**, 30: 944-952.
- Feingold KR, and Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA). **Update 2015**.
- Feng H, and Li XA. Dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **2009**, 16: 156-162.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, and Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, 246: 64-71.
- Ferchaud-Roucher V, Desnots E, Naël C, Agnoux AM, Alexandre-Gouabau MC, Darmaun D, and Boquien CY. Use of UPLC-ESI-MS/MS to quantitate free amino acid concentrations in micro-samples of mammalian milk. *Springerplus*, **2013**, 2: 622.
- Fisher WR, Venkatakrishnan V, Fisher ES, Stacpoole PW, and Zech LA. The <sup>3</sup>H-leucine tracer : its use in kinetic studies of plasma lipoproteins. *Metabolism*, **1997**, 46: 333-342.
- Fleming JK, Glass TR, Lackie SJ, and Wojciak JM. A novel approach for measuring sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid binding to carrier proteins using monoclonal antibodies and the Kinetic Exclusion Assay. *J Lipid Res*, **2016**, 57: 1737-1747.
- Florentin M, Liberopoulos EN, Wierzbicki AS, and Mikhailidis DP. Multiple actions of high-density lipoprotein. *Curr Opin Cardiol*, **2008**, 23: 370-378.
- Foster DM, Barrett PH, Toffolo G, Beltz WF, and Cobelli C. Estimating the fractional synthetic rate of plasma apolipoproteins and lipids from stable isotope data. *J Lipid Res*, **1993**, 34: 2193-2205.
- Franke JP, and de Zeeuw RA. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **1998**, 713: 51-59.
- Frischmann ME, Kronenberg F, Trenkwalder E, Schaefer JR, Schweer H, Dieplinger B, Koenig P, Ikewaki K, and Dieplinger H. In vivo turnover study demonstrates diminished clearance of lipoprotein(a) in hemodialysis patients. *Kidney Int*, **2007**, 71: 1036-1043.
- Friedewald WT, Levy RI, and Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, **1972**, 18: 499-502.

## -G-

- Gallart-Ayala H, Courant F, Severe S, Antignac JP, Morio F, Abadie J, and Le Bizec B. Versatile lipid profiling by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry using all ion fragmentation and polarity switching. Preliminary application for serum samples phenotyping related to canine mammary cancer. *Anal Chim Acta*, **2013**, 796: 75-83.
- García A, Godzien J, López-González Á, and Barbas C. Capillary electrophoresis mass spectrometry as a tool for untargeted metabolomics. *Bioanalysis*, **2017**, 9: 99-130.
- Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol*, **2010**, 688: 1-23.

- Gauthier MS, Pérusse JR, Awan Z, Bouchard A, Tessier S, Champagne J, Krastins B, Byram G, Chabot K, Garneau P, Rabasa-Lhoret R, Faubert D, Lopez MF, Seidah NG, and Coulombe B. A semi-automated mass spectrometric immunoassay coupled to selected reaction monitoring (MSIA-SRM) reveals novel relationships between circulating PCSK9 and metabolic phenotypes in patient cohorts. *Methods*, **2015**, 81: 66-73.
- Gitlin D, Cornwell DG, Nakasato D, Oncley JL, Hughes WL, and Janeway CA. Studies on the metabolism of plasma lipoproteins in the necrotic syndrome. II. The lipoproteins. *J Clin Invest*, **1958**, 37: 720-729.
- Gotto AM Jr, Pownall HJ, and Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*, **1986**, 128: 3-41.
- Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, and Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J*, **2001**, 355: 545-561.
- Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Yutuc E, Morgan AH, Gilmore I, Hearn T, Wang Y. Cholesteromics: An update. *Anal Biochem*, **2017**, pii: S0003-2697(17)30020-9.
- Guerrasio R, Haberhauer-Troyer C, Steiger M, Sauer M, Mattanovich D, Koellensperger G, and Hann S. Measurement uncertainty of isotopologue fractions in fluxomics determined via mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **2013**, 405: 5133-5146.
- Guinan T, Kirkbride P, Pigou PE, Ronci M, Kobus H, and Voelcker NH. Surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry techniques for application in forensics. *Mass Spectrom Rev*, **2015**, 34:627-640.

## -H-

- Hainline AJ, Karon J, and Kippel K. *Manual of Laboratory Operations: Lipid Research Clinics Program, Lipid and Lipoprotein Analysis*. 2nd edn. Washington, DC: Department of Health and Human Services, **1983**.
- Han X. Lipidomics for studying metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, **2016**, 12: 668-679.
- Hardman DA, and Kane JP. Isolation and characterization of apolipoprotein B-48. *Methods Enzymol*, **1986**, 128: 262-272.
- Harrison AG, Gaumann T, and Stahl D. Structure and Fragmentation of [C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O]<sup>+</sup> Ions Formed by Chemical Ionization. *Organic Mass Spectrometry*, **1983**, 18: 517-524.
- Havel RJ, Eder HA, and Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, **1955**, 34: 1345-1353.
- Hertzal AV, Thompson BR, Wiczler BM, and Bernlohr DA. Lipid metabolism in adipose tissue. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Vance DE and Vance JE, editors. Elsevier, Amsterdam. **2008**, 277-304.
- Hixson JE, and Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*, **1990**, 31: 545-548.
- Huang Y. Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases. *Curr Opin Lipidol*, **2010**, 21: 337-345.
- Humbert L. Solid phase extraction (SPE): theory and applications. *Ann Toxicol Anal*, **2010**, 22: 61-68.

- Hussain MM, Shi J, and Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res*, **2003**, 44: 22-32.

**-I-**

- Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM, Friedl W, Davignon J, and McCarthy BJ. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, **1990**, 31: 1337-1349.

**-J-**

- Jian W, Edom RW, Wang D, Weng N, and Zhang SW. Relative quantitation of glycoisoforms of intact apolipoprotein C3 in human plasma by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem*, **2013**, 85: 2867-2874.
- Jiang R, Schulze MB, Li T, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB, and Hu FB. Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B predict cardiovascular disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **2004**, 27: 1991-1997.
- Julve J, Escolà-Gil JC, Rotllan N, Fiévet C, Vallez E, de la Torre C, Ribas V, Sloan JH, and Blanco-Vaca F. Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2010**, 30: 232-238.

**-K-**

- Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J*, **1985**, 110: 1100-1107.
- Karas M, and Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal Chem*, **1988**, 60: 1299-2301.
- Karpe F, and Hamsten A. Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J Lipid Res*, **1994**, 35: 1311-1317.
- Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med*, **1999**, 246: 341-355.
- Karuna R, Park R, Othman A, Holleboom AG, Motazacker MM, Sutter I, Kuivenhoven JA, Rohrer L, Matile H, Hornemann T, Stoffel M, Rentsch KM, and von Eckardstein A. Plasma levels of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M in patients with monogenic disorders of HDL metabolism. *Atherosclerosis*, **2011**, 219: 855-863.
- Keshishian H, Addona T, Burgess M, Mani DR, Shi X, Kuhn E, Sabatine MS, Gerszten RE, and Carr SA. Quantification of cardiovascular biomarkers in patient plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics*, **2009**, 8, 2339-2249.
- Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, Teryukova NP. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis*, **1993**, 100: 13-18.

- Kontush A, and Chapman MJ. Lipidomics as a tool for the study of lipoprotein metabolism. *Curr Atheroscler Rep*, **2010**, 12: 194-201.
- Kraft ML, and Klitzing HA. Imaging lipids with secondary ion mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, **2014**, 1841: 1108-1119.
- Kronenberg F, and Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med*, **2013**, 273: 6-30.
- Kypreos KE, Karagiannides I, Fotiadou EH, Karavia EA, Brinkmeier MS, Giakoumi SM, and Tsompanidi EM. Mechanisms of obesity and related pathologies: role of apolipoprotein E in the development of obesity. *FEBS J*, **2009**, 276: 5720-5728.

## -L-

- Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol*, **2014**, 25: 387-393.
- Lagrost L, Masson D, and Chapman J. Lipoprotéines et métabolisme lipidique. *Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA)*, **2005**, <http://www.nsfa.asso.fr>.
- Lam SM, and Shui G. Lipidomics as a principal tool for advancing research. *J Genet Genomics*, **2013**, 40: 375-390.
- Lambert G, Thedrez A, Croyal M, Ramin-Mangata S, Couret D, Diotel N, Nobécourt-Dupuy E, Krempf M, LeBail JC, Poirier B, Blankenstein J, Villard EF, and Guillot E. The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies. *Clin Sci (Lond)*, **2017**, 131: 261-268.
- Lassman ME, McLaughlin TM, Somers EP, Stefanni AC, Chen Z, Murphy BA, Bierilo KK, Flattery AM, Wong KK, Castro-Perez JM, Hubbard BK, and Roddy TP. A rapid method for cross-species quantitation of apolipoproteins A1, B48 and B100 in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2012**, 26: 101-108.
- Lassman ME, McLaughlin TM, Zhou H, Pan Y, Marcovina SM, Laterza O, and Roddy TP. Simultaneous quantitation and size characterization of apolipoprotein(a) by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2014**, 28: 1101-1106.
- Le Bloc'h J, Leray V, Nazih H, Gauthier O, Serisier S, Magot T, Krempf M, Nguyen P, and Ouguerram K. Nicotinic Acid Accelerates HDL Cholesteryl Ester Turnover in Obese Insulin-Resistant Dogs. *PLoS One*, **2015**, 10: e0136934.
- Lee AY, Yates NA, Ichetovkin M, Deyanova E, Southwick K, Fisher TS, Wang W, Loderstedt J, Walker N, Zhou H, Zhao X, Sparrow CP, Hubbard BK, Rader DJ, Sitlani A, Millar JS, and Hendrickson RC. Measurement of fractional synthetic rates of multiple protein analytes by triple quadrupole mass spectrometry. *Clin Chem*, **2012**, 58: 619-627.
- Lichtenstein AH, Cohn JS, Hachey DL, Millar JS, Ordovas JM, and Schaefer EJ. Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein A-I and B-100 kinetics. *J Lipid Res*, **1990**, 31: 1693-1701.
- Liu J, Sempos CT, Donahue RP, Dorn J, Trevisan M, and Grundy SM. Non-high-density lipoprotein and very-low-density lipoprotein cholesterol and their risk predictive values in coronary heart disease. *Am J Cardiol*, **2006**, 98: 1363-1368.

- Liu HC, Lin DL, and McCurdy HH. Matrix Effects in the Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method of Analysis. *Forensic Sci Rev*, **2013**, 25: 65-78.
- Löfgren L, Ståhlman M, Forsberg GB, Saarinen S, Nilsson R, and Hansson GI. The BUME method: a novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. *J Lipid Res*, **2012**, 53: 1690-700.
- Luc G, Fievet C, Arveiler D, Evans AE, Bard JM, Cambien F, Fruchart JC, and Ducimetiere P. Apolipoproteins C-III and E in apoB- and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study. Etude Cas Témoins sur 'Infarctus du Myocarde. *J Lipid Res*, **1996**, 37: 508-517.
- Lynam K. Potential of Allergens in Aromatherapy Oils by GC/MS. Note d'application ([www.sepscience.com](http://www.sepscience.com)).

### -M-

- Magot T, Malmendier CL, Ouguerram K, Lontie JF, and Lutton C. In vivo effect of simvastatin on lipoprotein cholesteryl ester metabolism in normocholesterolemic volunteers. *Clin Chim Acta*, **1991**, 196: 59-68.
- Mahley RW, Huang Y, and Rall SC Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res*, **1999**, 40: 1933-1949.
- Marais DA, Blom DJ, Petrides F, Gouëffic Y, and Lambert G. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition. *Curr Opin Lipidol*, **2012**, 23: 511-517.
- Marchand J, Martineau E, Guitton Y, Dervilly-Pinel G, and Giraudeau P. Multidimensional NMR approaches towards highly resolved, sensitive and high-throughput quantitative metabolomics. *Curr Opin Biotechnol*, **2017**, 43: 49-55.
- Marcovina SM, Albers JJ, Scanu AM, Kennedy H, Giaculli F, Berg K, Couderc R, Dati F, Rifai N, Sakurabayashi I, Tate JR, and Steinmetz A. Use of a reference material proposed by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein(a). *Clin Chem*, **2000**, 46: 1956-1967.
- Martínez-Morillo E, Nielsen HM, Batruch I, Drabovich AP, Begcevic I, Lopez MF, Minthon L, Bu G, Mattsson N, Portelius E, Hansson O, and Diamandis EP. Assessment of peptide chemical modifications on the development of an accurate and precise multiplex selected reaction monitoring assay for apolipoprotein e isoforms. *J Proteome Res*, **2014**, 13: 1077-1087.
- Maugeais C, Ouguerram K, Krempf M, Maugeais P, Gardette J, Bigot E, and Magot T. A minimal model using stable isotopes to study the metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. *Diabetes Metab*, **1996**, 22: 57-63.
- McConnell JP, Guadagno PA, Dayspring TD, Hoefner DM, Thiselton DL, Warnick GR, and Harris WS. Lipoprotein(a) mass: a massively misunderstood metric. *J Clin Lipidol*, **2014**, 8: 550-553.
- McFarlane AS. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature*, **1958**, 182: 53-130.
- McLaren DG, He T, Wang SP, Mendoza V, Rosa R, Gagen K, Bhat G, Herath K, Miller PL, Stribling S, Taggart A, Imbriglio J, Liu J, Chen D, Pinto S, Balkovec JM, Devita RJ, Marsh DJ, Castro-Perez JM,

Strack A, Johns DG, Previs SF, Hubbard BK, and Roddy TP. The use of stable-isotopically labeled oleic acid to interrogate lipid assembly in vivo: assessing pharmacological effects in preclinical species. *J Lipid Res*, **2013a**, 52: 1150-1161.

- McLaren DG, Cardasis HL, Stout SJ, Wang SP, Mendoza V, Castro-Perez JM, Miller PL, Murphy BA, Cumiskey AM, Cleary MA, Johns DG, Previs SF, and Roddy TP. Use of [13C18] oleic acid and mass isotopomer distribution analysis to study synthesis of plasma triglycerides in vivo: analytical and experimental considerations. *Anal Chem*, **2013b**, 85: 6287-6294.
- Medzihradsky KF, and Chalkley RJ. Lessons in de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, **2015**, 34: 43-63.
- Mi S, Zhao YY, Dielschneider RF, Gibson SB, and Curtis JM. An LC/MS/MS method for the simultaneous determination of individual sphingolipid species in B cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2016**, 1031: 50-60.
- Morelato M, Beavis A, Kirkbride P, and Roux C. Forensic applications of desorption electrospray ionisation mass spectrometry (DESI-MS). *Forensic Sci Int*, **2013**, 226: 10-21.

### -N-

- Nestel PJ, and Barter PJ. Triglyceride clearance during diets rich in carbohydrate or fats. *Am J Clin Nutr*, **1973**, 26: 241-245.
- Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Meikle PJ, and Barrett PH. Association of Plasma Ceramides and Sphingomyelin With VLDL apoB-100 Fractional Catabolic Rate Before and After Rosuvastatin Treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, **2015**, 100: 2497-2501.
- Nier AOC, Ney EP, and Ingham MG. Adjustable Gas Leak. *Review of Scientific Instruments*, **1947**, 18: 191.
- Nikolaev EN, Kostyukevich YI, and Vladimirov GN. Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations. *Mass Spectrom Rev*, **2016**, 35: 219-258.

### -O-

- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, and Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*, **1998**, 16: 373-378.
- Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Nielsen LB, Plomgaard P, Dahlbäck B, and Barrett PH. Association of apolipoprotein M with high-density lipoprotein kinetics in overweight-obese men. *Atherosclerosis*, **2010**, 210: 326-330.
- Ooi EM, Chan DT, Watts GF, Chan DC, Ng TW, Dogra GK, Irish AB, Barrett PH. Plasma apolipoprotein C-III metabolism in patients with chronic kidney disease. *J Lipid Res*, **2011**, 52: 794-800.
- Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Pang J, Tenneti VS, Hamilton SJ, McCormick SP, Marcovina SM, and Barrett PH. Effects of extended-release niacin on the postprandial metabolism of Lp(a) and ApoB-100-containing lipoproteins in statin-treated men with type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2015**, 35: 2686-2693.

- Ouguerram K, Krempf M, Maugeais C, Maugeère P, Darmaun D, and Magot T. A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans. *Metabolism*, **2002**, 51: 5-11.
- Ouguerram K, Nguyen P, Krempf M, Pouteau E, Briand F, Bailhache E, and Magot T. Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl ester in the dog, a species lacking in cholesteryl ester transfer protein activity; An in vivo approach using stable isotopes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **2004**, 138: 339-345.

**-P-**

- Paglia G, Kliman M, Claude E, Geromanos S, and Astarita G. Applications of ion-mobility mass spectrometry for lipid analysis. *Anal Bioanal Chem*, **2015**, 407: 4995-5007.
- Pan Y, Zhou H, Mahsut A, Rohm RJ, Berejnaia O, Price O, Chen Y, Castro-Perez J, Lassman ME, McLaren D, Conway J, Jensen KK, Thomas T, Reyes-Soffer G, Ginsberg HN, Gutstein DE, Cleary M, Previs SF, and Roddy TP. Static and turnover kinetic measurement of protein biomarkers involved in triglyceride metabolism including apoB48 and apoA5 by LC/MS/MS. *J Lipid Res*, **2014**, 55: 1179-1187.
- Pandiscia L. Analysis of Sugars by HPLC-ELSD. Note d'application (www.jascoinc.com).
- Parhofer KG, Barrett PHR, and Schwandt P. LDL apolipoprotein B metabolism: comparison of two methods to establish kinetics parameters. *Atherosclerosis*, **1999**, 144: 159-166.
- Pati S, Nie B, Arnold RD, and Cummings BS. Extraction, chromatographic and mass spectrometric methods for lipid analysis. *Biomed Chromatogr*, **2016**, 30: 695-709.
- Patterson BW, and Lee AM. Self-association and phospholipid binding properties of iodinated apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, **1986**, 25: 4953-4957.
- Patterson BW, Hachey DL, Cook GL, Amann JM, and Klein PD. Incorporation of a stable isotopically labeled amino acid into multiple human apolipoproteins. *J Lipid Res*, **1991**, 32: 1063-1072.
- Penttilä I, Huhtikangas A, Herranen J, Eskelinen S, and Moilanen O. Simultaneous measurement of free and esterified fatty acids by gas chromatography from normal and type IV hyperlipoproteinaemic sera. *Ann Clin Res*, **1984**, 16: 13-17.
- Percy AJ, Chambers AG, Yang J, Hardie DB, Borchers CH. Advances in multiplexed MRM-based protein biomarker quantitation toward clinical utility. *Biochim Biophys Acta*, **2014**, 1844:917-926.
- Perry RH, Cooks RG, and Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom Rev*, **2008**, 27: 661-699.
- Pinkston JD, Wen D, Morand KL, Tirey DA, and Stanton DT. Comparison of LC/MS and SFC/MS for screening of a large and diverse library of pharmaceutically relevant compounds. *Anal Chem*, **2006**, 78: 7467-7472.
- Pont F, Duvillard L, Maugeais C, Athias A, Perségol L, Gambert P, and Vergès B. Isotope ratio mass spectrometry, compared with conventional mass spectrometry in kinetic studies at low and high enrichment levels: application to lipoprotein kinetics. *Anal Biochem*, **1997**, 248: 277-287.
- Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, and Scott J. A novel form of tissue specific RNA processing produces apolipoprotein B48 in intestine. *Cell*, **1987**, 50: 831-840.

- Previs SF, McLaren DG, Wang SP, Stout SJ, Zhou H, Herath K, Shah V, Miller PL, Wilsie L, Castro-Perez J, Johns DG, Cleary MA, Roddy TP. New methodologies for studying lipid synthesis and turnover: looking backwards to enable moving forwards. *Biochim Biophys Acta*, **2014**, 1842: 402-413.
- Pyne S, Adams DR, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: Recent advances. *Prog Lipid Res*, **2016**, 62: 93-106.

### -Q-

- Qi J, Lang W, Geisler JG, Wang P, Petrounia I, Mai S, Smith C, Askari H, Struble GT, Williams R, Bhanot S, Monia BP, Bayoumy S, Grant E, Caldwell GW, Todd MJ, Liang Y, Gaul MD, Demarest KT, and Connelly MA. The use of stable isotope-labeled glycerol and oleic acid to differentiate the hepatic functions of DGAT1 and -2. *J Lipid Res*, **2012**, 53: 1106-1116.
- Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, Bandyopadhyay S, Jones KN, Kelly S, Shaner RL, Sullards CM, Wang E, Murphy RC, Barkley RM, Leiker TJ, Raetz CR, Guan Z, Laird GM, Six DA, Russell DW, McDonald JG, Subramaniam S, Fahy E, and Dennis EA. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*, **2010**, 51: 3299-3305.

### -R-

- Raffaelli A, and Saba A. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, **2003**, 22:318-331.
- Ramakrishnan R, Arad Y, Wong S, and Ginsberg HN. Nonuniform radiolabeling of VLDL apolipoprotein B: implications for the analysis of studies of the kinetics of the metabolism of lipoproteins containing apolipoprotein B. *J Lipid Res*, **1990**, 31: 1031-1042.
- Ren K, Tang ZL, Jiang Y, Tan YM, and Yi GH. Apolipoprotein M. *Clin Chim Acta*, **2015**, 446: 21-29.
- Reyes-Soffer G, Pavlyha M, Ngai C, Thomas T, Holleran S, Ramakrishnan R, Karmally W, Nandakumar R, Fontanez N, Obunike J, Marcovina SM, Lichtenstein AH, Matthan NR, Matta J, Maroccia M, Becue F, Poitiers F, Swanson B, Cowan L, Sasiela WJ, Surks HK, and Ginsberg HN. Effects of PCSK9 Inhibition With Alirocumab on Lipoprotein Metabolism in Healthy Humans. *Circulation*, **2017**, 135: 352-362.
- Rimbart A, Pichelin M, Lecoite S, Marrec M, Le Scouarnec S, Barrak E, Croyal M, Krempf M, Le Marec H, Redon R, Schott JJ, Magré J, and Cariou B. Identification of novel APOB mutations by targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of familial hypobetalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, **2016**, 250: 52-56.
- Romagnuolo R, Scipione CA, Boffa MB, Marcovina SM, Seidah NG, and Koschinsky ML. Lipoprotein (a) catabolism is regulated by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 through the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, **2015**, 290: 11649-11662
- Rosen H, Stevens RC, Hanson M, Roberts E, and Oldstone MB. Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence. *Annu Rev Biochem*, **2013**, 82: 637-662.

- Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, **2012**, 125:1905-1919.
- Rostom AA, and Robinson CV. Detection of the intact GroEL chaperonin assembly by mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, **1999**, 121: 4718-4719.
- Roux A, Lison D, Junot C, and Heilier JF. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clin Biochem*, **2011**, 44: 119-135.
- Rye KA, and Barter PJ. Cardioprotective functions of HDLs. *J Lipid Res*, **2014**, 55: 168-179.

-S-

- Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, Pfeffer MA, and Braunwald E. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*, **2000**, 102: 1886-1892.
- Sandra K, Pereira Ados S, Vanhoenacker G, David F, and Sandra P. Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **2010**, 1217: 4087-4099.
- Santa T, Al-Dirbashi OY, and Fukushima T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for biomedical analysis. *Drug Discov Ther*, **2007**, 1: 108-118.
- Sargent M (Ed.), Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee, **2013**. ISBN 978-0-948926-27-3.
- Schaefer JR, Rader DJ, and Brewer HB Jr. Investigation of lipoprotein kinetics using endogenous labeling with stable isotopes. *Curr Opin Lipidol*, **1992**, 3: 227-232.
- Schierbeek H, van den Akker CH, Fay LB, and van Goudoever JB. High-precision mass spectrometric analysis using stable isotopes in studies of children. *Mass Spectrom Rev*, **2012**, 31: 312-330.
- Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, and Mbikay M. PCSK9 A Key Modulator of Cardiovascular Health. *Circ Res*, **2014**, 114: 1022-1036.
- Shai I, Rimm EB, Hankinson SE, Curhan G, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ, and Ma J. Multivariate assessment of lipid parameters as predictors of coronary heart disease among postmenopausal women: potential implications for clinical guidelines. *Circulation*, **2004**, 110: 2824-2830.
- Shankaran M, King CL, Angel TE, Holmes WE, Li KW, Colangelo M, Price JC, Turner SM, Bell C, Hamilton KL, Miller BF, and Hellerstein MK. Circulating protein synthesis rates reveal skeletal muscle proteome dynamics. *J Clin Invest*, **2016**, 126: 288-302.
- Sharma M, Redpath GM, Williams MJ, and McCormick SP. Recycling of Apolipoprotein(a) After PlgRKT-Mediated Endocytosis of Lipoprotein(a). *Circ Res*, **2017**, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310272
- Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, and Visvikis S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem*, **1995**, 41: 1068-1086.

- Siest G, Schlenck A, Starck M, Vincent-Viry M, Schiele F, and Visvikis S. Apolipoprotein E: laboratory determinations and clinical interest. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. *Handbook of Lipoprotein Testing*. 2nd edn. Washington DC: AACC Press, **2000**:401-440.
- Smith D, Watts GF, Dane-Stewart C, and Mamo JC. Post-prandial CM response may be predicted by a single measurement of plasma apolipoprotein B48 in the fasting state. *Eur J Clin Invest*, **1999**, 29: 204-209.
- Stellaard F, and Lütjohann. Fractional cholesterol absorption measurements in humans: Determinants of the blood-based dual stable isotope tracer technique. *J Clin Lipidol*, **2015**, 9: 14-25.
- Sternson LA. The application of chemical derivatization to clinical drug analysis. *Xenobiotica*, **1987**, 17: 385-396.
- Su JW, Nzekwu MMU, Cabezas MC, Redgrave T, and Proctor SD. Methods to assess impaired post-prandial metabolism and the impact for early detection of cardiovascular disease risk. *Eur J Clin Invest*, **2009**, 39: 741-754.
- Sun F, Stolinski M, Shojaee-Moradie F, Lou S, Ma Y, Hovorka R, and Umpleby AM. A novel method for measuring intestinal and hepatic triacylglycerol kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2013**, 305:E1041-7.
- Suu A, Jalukse L, Liigand J, Kruve A, Himmel D, Krossing I, Rosés M, and Leito I. Unified pH values of liquid chromatography mobile phases. *Anal Chem*, **2015**, 87: 2623-2630.

### -T-

- Tavori H, Christian DC, Minnier J, Plubell D, Shapiro MD, Yeang C, Giunzioni I, Croyal M, Duell PB, Lambert G, Tsimikas S, and Fazio S. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ Res*, **2016**, 119 : 29-35.
- Thompson A, and Danesh J. Association between apolipoprotein B, apolipoprotein A1, the apolipoprotein B/A1 ratio and coronary heart disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies. *J Intern Med*, **2006**, 259: 481-492.
- Tito MA, Tars K, Valegard K, Hajdu J, and Robinson CV. Electrospray time-of-flight mass spectrometry of the intact MS2 virus capsid. *J Am Chem Soc*, **2000**, 122: 3550-3551.
- Tiwari S, and Siddiqi S, Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2012**, 32: 1079-1086.

### -U-

- Utermann G. Apolipoprotein E polymorphisms in health and disease. *Am Heart J*, **1987**, 113: 433-440.

### -V-

- Villard EF, Thedrez A, Blankenstein J, Croyal M, Thi-Thu-Trang T, Poirier B, Le Bail JC, Illiano S, Nobécourt E, Krempf M, Marais AD, Blom DJ, Muslin AJ, Guillot E, and Lambert G. PCSK9 modulates the secretion but not the cellular uptake of Lipoprotein (a) ex vivo: an effect blunted by alirocumab. *JACC Basic Transl Sci*, **2016**, 1 : 419-427.

- Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, and Weiner R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res*, **2007**, 24: 1962-1973.
- von Eckardstein A, Huang Y, and Assman G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*, **1994**, 5: 404-416.

**-W-**

- Watts GF, Barrett PHR, Ji J, Serone AP, Chan DC, Croft KD, Loehrer F, and Johnson AG. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes*, **2003**, 52: 803-811.
- Wei F, Hu N, Lv X, Dong XY, Chen H. Quantitation of triacylglycerols in edible oils by off-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using a single column. *J Chromatogr A*, **2015**, 1404: 60-71.
- Weinberg RB. Apolipoprotein A-IV polymorphisms and diet-gene interactions. *Curr Opin Lipidol*, **2002**, 13: 125-134.
- Werner E. Thèse de doctorat. Analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse: Application à la recherche de biomarqueurs indirects d'induction enzymatique. Soutenue le 29-09-2011, Université Paris-Sud 11.
- Westaway KC. Using kinetic isotope effects to determine the structure of the transition states of SN2 reactions. *Adv Phys Org Chem*, **2006**, 41: 217-273.
- Wilkinson DJ, Franchi MV, Brook MS, Narici MV, Williams JP, Mitchell WK, Szewczyk NJ, Greenhaff PL, Atherton PJ, Smith K. A validation of the application of D(2)O stable isotope tracer techniques for monitoring day-to-day changes in muscle protein subfraction synthesis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2014**, 306: E571-E579.
- Williams RE, Major H, Lock EA, Lenz EM, and Wilson ID. D-Serine-induced nephrotoxicity: a HPLC-TOF/MS-based metabolomics approach. *Toxicology*, **2005**, 207: 179-190.

**-X-**

- Xie F, Emery MG, Gibbs JP, Rock DA, and Rock BM. SRM-based measurements of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and lipoprotein(a) kinetics in nonhuman primate serum. *Bioanalysis*, **2016**, 8: 2551-2563.

**-Y-**

- Yamashita M, and Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem*, **1984a**, 88: 4451-4459.
- Yamashita M, and Fenn JB. Negative ion production with the electrospray ion source. *J Phys Chem*, **1984b**, 88: 4671-4675.

- Yates JR 3<sup>rd</sup>. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom*, **1998**, 33: 1-19.

-Z-

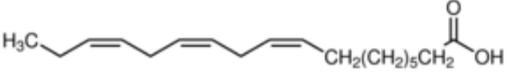
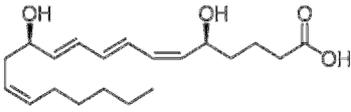
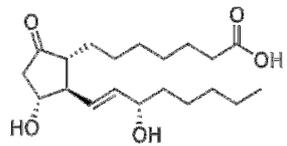
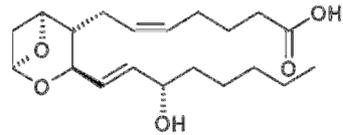
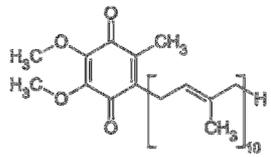
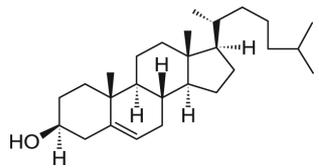
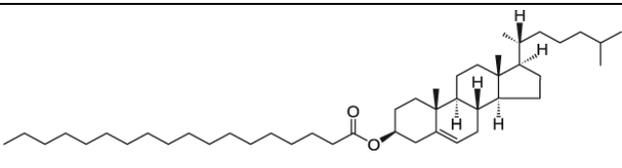
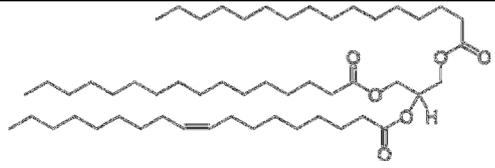
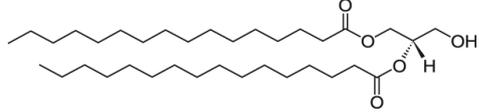
- Zamboni N. Towards metabolome-based <sup>13</sup>C flux analysis: a universal tool for measuring in vivo metabolic activity. *Top Current Genet*, **2007**, 18: 129-167.
- Zhang XY, Dong X, Zheng L, Luo GH, Liu YH, Ekström U, Nilsson-Ehle P, Ye Q, and Xu N. Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization. *Acta Histochem*, **2003**, 105: 67-72.
- Zhao Y, Van Berkel TJ, and Van Eck M. Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol*, **2010**, 21: 441-453.
- Zhou H, Li W, Wang SP, Mendoza V, Rosa R, Hubert J, Herath K, McLaughlin T, Rohm RJ, Lassman ME, Wong KK, Johns DG, Previs SF, Hubbard BK, and Roddy TP. Quantifying apoprotein synthesis in rodents: coupling LC-MS/MS analyses with the administration of labeled water. *J Lipid Res*, **2012**, 53: 1223-1231.
- Zhou H, Castro-Perez J, Lassman ME, Thomas T, Li W, McLaughlin T, Dan X, Jumes P, Wagner JA, Gutstein DE, Hubbard BK, Rader DJ, Millar JS, Ginsberg HN, Reyes-Soffer G, Cleary M, Previs SF, and Roddy TP. Measurement of apo(a) kinetics in human subjects using a microfluidic device with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2013**, 27: 1294-1302.
- Zhou Q, Gao B, Zhang X, Xu Y, Shi H, and Yu LL. Chemical profiling of triacylglycerols and diacylglycerols in cow milk fat by ultra-performance convergence chromatography combined with a quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem*, **2014**, 143:199-204.

# ANNEXES

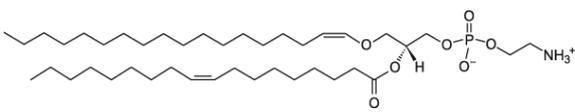


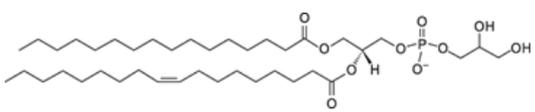
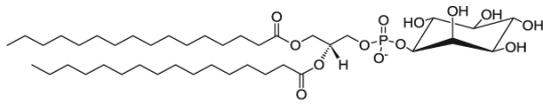
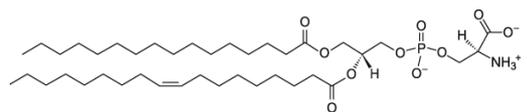
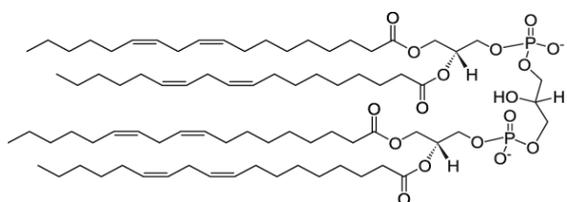
## Annexe A

### Exemples de structures chimiques des lipides

Familles	Sous-espèces	Formules développées
Acyls gras	Acide gras <i>Acide linoléique, C18:3</i>	
	Leucotriène <i>B4 (LTB4)</i>	
Eicosanoïdes	Prostaglandine <i>E1 (PGE1)</i>	
	Thromboxane <i>A2 (TXA2)</i>	
Prénols	Coenzyme Q10 <i>CoQ10</i>	
Stérols	Stérol libre <i>Cholestérol</i>	
	Stérol estérifié <i>Cholestérol estérifié, acide stéarique C18:0</i>	
Glycérolipides	Triglycéride <i>TG (50:1) ou TG (16:0/16:0/18:1)</i>	
	Diglycéride <i>DG (32:0) ou DG (16:0/16:0)</i>	

Familles	Sous-espèces	Formules développées
Sphingolipides	Sphinganine <i>Sph d18:0</i>	
	Sphingosine <i>Sph d18:1</i>	
	Sphingosine-1-phosphate <i>S1P</i>	
	Céramide <i>Cer (d18 :1/16:0)</i>	
	Sphingomyéline <i>SM (d18:1/16:0)</i>	
Glycérophospholipides	Acide phosphatidique <i>PA (34:1) ou PA (16:0/18:1)</i>	
	Phosphatidylcholine <i>PC (34:1) ou PC (16:0/18:1)</i>	
	Lysophosphatidylcholine <i>LPC (16:0) ou PC (16:0/0:0)</i>	
	Phosphatidyléthanolamine <i>PE (36:1) ou PE (18:0/18:1)</i>	

	Plasmalogène  <i>PE (36:1p) ou</i> <i>PE (18:0p/18:1)</i>	
--	--	--

Familles	Sous-espèces	Formules développées
Glycérophospholipides	Phosphatidylglycérol  <i>PG (34:1) ou</i> <i>PG (16:0/18:1)</i>	
	Phosphatidylinositol  <i>PI (34:1) ou</i> <i>PI (16:0/18:1)</i>	
	Phosphatidylsérine  <i>PS (34:1) ou</i> <i>PS (16:0/18:1)</i>	
	Cardiolipine  <i>CL (72:8) ou</i> <i>CI (18:2/18:2/18:2/18:2)</i>	



## Annexe B

# Résumés des publications collaboratives

### PCSK9 Association With Lipoprotein(a)

Tavori H, Christian D, Minnier J, Plubell D, Shapiro MD, Yeang C, Giunzioni I, Croyal M,  
Duell PB, Lambert G, Tsimikas S, Fazio S

*Circ Res*, 2016, 119: 29-35

#### ABSTRACT

**Rationale:** Lipoprotein(a) [Lp(a)] is a highly atherogenic low-density lipoprotein-like particle characterized by the presence of apoprotein(a) [apo(a)] bound to apolipoprotein B. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) selectively binds low-density lipoprotein; we hypothesized that it can also be associated with Lp(a) in plasma.

**Objective:** Characterize the association of PCSK9 and Lp(a) in 39 subjects with high Lp(a) levels (range 39-320 mg/dL) and in transgenic mice expressing either human apo(a) only or human Lp(a) (via coexpression of human apo(a) and human apolipoprotein B).

**Methods and results:** We show that PCSK9 is physically associated with Lp(a) in vivo using 3 different approaches: (1) analysis of Lp(a) fractions isolated by ultracentrifugation; (2) immunoprecipitation of plasma using antibodies to PCSK9 and immunodetection of apo(a); (3) ELISA quantification of Lp(a)-associated PCSK9. Plasma PCSK9 levels correlated with Lp(a) levels, but not with the number of kringle IV-2 repeats. PCSK9 did not bind to apo(a) only, and the association of PCSK9 with Lp(a) was not affected by the loss of the apo(a) region responsible for binding oxidized phospholipids. Preferential association of PCSK9 with Lp(a) versus low-density lipoprotein (1.7-fold increase) was seen in subjects with high Lp(a) and normal low-density lipoprotein. Finally, Lp(a)-associated PCSK9 levels directly correlated with plasma Lp(a) levels but not with total plasma PCSK9 levels.

**Conclusions:** Our results show, for the first time, that plasma PCSK9 is found in association with Lp(a) particles in humans with high Lp(a) levels and in mice carrying human Lp(a). Lp(a)-bound PCSK9 may be pursued as a biomarker for cardiovascular risk.

## Identification of novel APOB mutations by targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of familial hypobetalipoproteinemia

Rimbert A, Pichelin M, Lecointe S, Marrec M, Le Scouarnec S, Barrak E, Croyal M, Krempf M, Le Marec H, Redon R, Schott JJ, Magré J, Cariou B

*Atherosclerosis*, 2016, 250: 52-56

### ABSTRACT

**Background and aims:** Familial hypobetalipoproteinemia (FHBL) is a co-dominant disorder characterized by decreased plasma levels of LDL-cholesterol and apolipoprotein B (ApoB). Currently, genetic diagnosis in FHBL relies largely on Sanger sequencing to identify APOB and PCSK9 gene mutations and on western blotting to detect truncated ApoB species.

**Methods:** Here, we applied targeted enrichment and next-generation sequencing (NGS) on a panel of three FHBL genes and two abetalipoproteinemia genes (APOB, PCSK9, ANGPTL3, MTTP and SAR1B).

**Results:** In this study, we identified five likely pathogenic heterozygous rare variants. These include four novel nonsense mutations in APOB (p.Gln845\*, p.Gln2571\*, p.Cys2933\* and p.Ser3718\*) and a rare variant in PCSK9 (Minor Allele Frequency <0.1%). The affected family members tested were shown to be carriers, suggesting co-segregation with low LDL-C.

**Conclusions:** Our study further demonstrates that NGS is a reliable and practical approach for the molecular screening of FHBL-causative genes that may provide a mean for deciphering the genetic basis in FHBL.

## **PCSK9 and lipoprotein (a) levels are two predictors of coronary artery calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolemia**

Alonso R, Mata P, Muñiz O, Fuentes-Jimenez F, Díaz JL, Zambón D, Tomás M, Martín C, Moyon T, Croyal M, Thedrez A, Lambert G

*Atherosclerosis*, **2016**, 254: 249-253

### **ABSTRACT**

**Background and aims:** We aimed to assess whether elevated PCSK9 and lipoprotein (a) [Lp(a)] levels associate with coronary artery calcification (CAC), a good marker of atherosclerosis burden, in asymptomatic familial hypercholesterolemia.

**Methods:** We selected 161 molecularly defined FH patients treated with stable doses of statins for more than a year. CAC was measured using the Agatston method and quantified as categorical variable. Fasting plasma samples were collected and analyzed for lipids and lipoproteins. PCSK9 was measured by ELISA, Lp(a) and apolipoprotein (a) concentrations by immunoturbidimetry and LC-MS/MS, respectively.

**Results:** Circulating PCSK9 levels were significantly reduced in patients without CAC (n = 63), compared to those with CAC (n = 99). Patients with the highest CAC scores (above 100) had the highest levels of circulating PCSK9 and Lp(a). In multivariable regression analyses, the main predictors for a positive CAC score was age and sex followed by circulating PCSK9 and Lp(a) levels.

**Conclusions:** In statin treated asymptomatic FH patients, elevated PCSK9 and Lp(a) levels are independently associated with the presence and severity of CAC, a good predictor of coronary artery disease.

## **PCSK9 Modulates the Secretion But Not the Cellular Uptake of Lipoprotein(a) Ex Vivo : An Effect Blunted by Alirocumab**

Villard EF, Thedrez A, Blankenstein J, Croyal M, Thi-Thu-Trang T, Poirier B, Le Bail JC, Illiano S, Nobécourt E, Krempf M, Marais AD, Blom DJ, Muslin AJ, Guillot E, Lambert G

*JACC Basic Transl Sci*, **2016**, 1: 419-427

### **SUMMARY**

To elucidate how the proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) inhibitor alirocumab modulates lipoprotein(a) [Lp(a)] plasma levels, the authors performed a series of Lp(a) uptake studies in primary human hepatocytes and dermal fibroblasts and measured Lp(a) secretion from human hepatocytes. They found that Lp(a) cellular uptake occurred in a low-density lipoprotein receptor-independent manner. Neither PCSK9 nor alirocumab altered Lp(a) internalization. By contrast, the secretion of apolipoprotein (a) from human hepatocytes was sharply increased by PCSK9, an effect that was reversed by alirocumab. They propose that PCSK9 does not significantly modulate Lp(a) catabolism, but rather enhances the secretion of Lp(a) from liver cells.

### **HIGHLIGHTS**

- Unlike LDL uptake, Lp(a) uptake is not altered by PCSK9 or PCSK9 inhibition in primary human hepatocytes and in primary dermal fibroblasts isolated from familial hypercholesterolemic and non-familial hypercholesterolemic patients.
- Lp(a) uptake is occurring in the absence of a functional LDL receptor and is not affected by LDL receptor blockade with monoclonal antibodies.
- Lp(a) cellular binding and whole particle uptake are not altered by PCSK9.
- The secretion of Lp(a) from primary human hepatocytes is enhanced by PCSK9, an effect that is blunted by PCSK9 inhibition with alirocumab.

## **The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies**

Lambert G, Thedrez A, Croyal M, Ramin-Mangata S, Couret D, Diotel N, Nobécourt-Dupuy E, Krempf M, LeBail JC, Poirier B, Blankenstein J, Villard EF, Guillot E

*Clin Sci (Lond)*, 2017, 131: 261-268

### **ABSTRACT**

Since 2012, clinical trials dedicated to proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) inhibition with monoclonal antibodies (mAbs) have unambiguously demonstrated robust reductions not only in low-density lipoprotein (LDL) cholesterol (LDL-C) but also in lipoprotein (a) [Lp(a)] levels. The scientific literature published prior to those studies did not provide any evidence for a link between PCSK9 and Lp(a) metabolism. More recent investigations, either in vitro or in vivo, have attempted to unravel the mechanism(s) by which PCSK9 mAbs reduce circulating Lp(a) levels, with some showing a specific implication of the LDL receptor (LDLR) in Lp(a) clearance whereas others found no significant role for the LDLR in that process. This elusive pathway appears clearly distinct from that of the widely prescribed statins that also enhance LDLR function but do not lower circulating Lp (a) levels in humans. So how does PCSK9 inhibition with mAbs reduce Lp(a)? This still remains to be established.