



**HAL**  
open science

# Analyses de macrophages : de la lipidomique à l'oxylipidomique

Guillaume Sayet

► **To cite this version:**

Guillaume Sayet. Analyses de macrophages : de la lipidomique à l'oxylipidomique. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS198 . tel-01885529

**HAL Id: tel-01885529**

**<https://theses.hal.science/tel-01885529>**

Submitted on 2 Oct 2018

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

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

# Analyses de macrophages : de la lipidomique à l'oxylipidomique

NNT: 2018SACLS198

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,  
instrumentation et biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat: Chimie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 21/09/2018, par

**Guillaume Sayet**

Composition du Jury :

<b>Dominique Bonnefont-Rousselot</b> Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Descartes	Présidente
<b>Jean-François Goossens</b> Professeur, Université de Lille	Rapporteur
<b>Eric Marchioni</b> Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
<b>Natalie Fournier</b> Maître de conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Sud	Examineur
<b>Christophe Cordella</b> Ingénieur de recherche (HDR), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)	Examineur
<b>Pierre Chaminade</b> Professeur, Université Paris-Sud	Directeur de thèse



# Remerciements

---

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Jean-François Goossens et le Professeur Eric Marchioni qui ont accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteurs. Mes plus vifs remerciements vont également au Professeur Dominique Bonnefont-Rousselot et au Docteur Christophe Cordella qui ont généreusement accepté de faire partie de ce jury.

J'exprime ma chaleureuse reconnaissance au Professeur Pierre Chaminade qui m'a fait l'honneur de me confier ce travail de thèse. Un grand merci aussi pour votre disponibilité, vos conseils ; j'espère avoir été à la hauteur de votre confiance.

Ma gratitude s'adresse tout particulièrement au Professeur Jean-Louis Paul et au Docteur Natalie Fournier. Merci pour le temps que vous m'avez consacré, vos conseils, remarques et vos inappréciables synthèses bibliographiques.

Je saurais également gré à l'ensemble des membres de l'équipe de lip(sys)<sup>2</sup> et en particulier le Docteur Eric Caudron et Sana Tfaili. Merci pour votre soutien, votre aide et vos conseils.

Je n'oublie pas non plus Audrey Solgadi pour son aide précieuse tout au long de ces années universitaires ainsi que Fatima.

Et enfin un grand merci à mes proches et en particulier à Delphine qui a eu à supporter mes humeurs durant cette période.

# Résumé

---

**Mots clés :** Lipidomique, Macrophages, Analyses multivariées

L'athérosclérose est un phénomène inflammatoire caractérisé par un dépôt sur les artères de macrophages gorgés de cholestérol également appelés cellules spumeuses. Actuellement, trois principales molécules membranaires sont décrites comme assurant la sortie du cholestérol libre, dont l'ABCA1 (ATP Binding Cassette A1) qui joue un rôle physiologique important.

Le but de ce travail est d'étudier l'impact de l'incorporation d'acides gras  $\omega$ 3 et celui de LDL modifiées sur la composition des phospholipides membranaires et d'établir des liens entre la modification de composition des phospholipides et l'altération du fonctionnement de l'ABCA1. Une étude lipidomique a été menée, en utilisant des méthodes de chromatographie couplées à la spectrométrie de masse. Les analyses ont été réalisées au moyen d'un système de chromatographie liquide en phase normale (NP-LC) permettant la séparation des différents phospholipides. La détection a été réalisée à l'aide de spectromètres de masse (MS) basse et ultra-haute résolution, ainsi que d'un détecteur à aérosol chargé. La chromatographie en phase gazeuse permet de connaître les proportions relatives d'acides gras. Ces techniques ont été utilisées pour réaliser une étude sur les paramètres de prétraitement (en amont du traitement des signaux analytiques), de décrire le lipidome de différents types de macrophages et d'établir les modifications de composition des phospholipides lors d'ajout chronique d'acides gras  $\omega$ 3 et/ou de LDL modifiées.

Les résultats obtenus ont permis de définir une méthode de prétraitement de données LC-MS, d'évaluer la composition de trois types de macrophages et de modéliser les variations de l'efflux du cholestérol avec les modifications phospholipidiques observées pour les macrophages non spumeux. A partir de ces éléments, des thématiques communes, chimie biologique, ont pu aussi être identifiées comme l'analyse de « l'oxylipidome ».

# Abstract

---

**Keywords:** Lipidomic, Macrophages, Multivariate analysis

Atherosclerosis is an inflammatory disease characterized by a deposit on the arteries of macrophages full of cholesterol also called foam cells. Currently, three main membrane molecules are described as ensuring the release of free cholesterol, of which ABCA1 (ATP Binding Cassette A1) plays an important physiological role.

The purpose of this work is to study the impact of the incorporation of  $\omega$ 3 fatty acids and modified LDL on membrane phospholipids composition and to establish the relationship between modification of the phospholipid composition and functionality of ABCA1. A lipidomic study was conducted using chromatographic methods coupled with mass spectrometry. Analyzes were carried out using normal phase liquid chromatography (NP-LC) allowing the separation of the different phospholipid classes. Detection was performed using low and ultra-high resolution mass spectrometers (MS) and a charged aerosol detector. Gas chromatography is used to determine fatty acids proportions. These techniques were used to study pretreatment parameters, to describe different macrophages lipidome and to establish phospholipid modifications during  $\omega$ 3 fatty acids chronic addition and / or modified LDL.

The results obtained made it possible to define a method for LC-MS data pretreatment, to evaluate the composition of three types of macrophages, to model the variations of cholesterol efflux with the phospholipid modifications observed for non-foamy macrophages. From these elements, common themes, chemistry biology, could also be identified as the analysis of "oxylipidome".

# Sommaire

---

<b>Chapitre I : Généralités</b> .....	1
<b>De la classification des lipides à l'analyse lipidomique</b> .....	1
1 Les lipides .....	1
1.1 Les acides gras .....	1
1.2 Glycérolipides .....	3
1.3 Glycérophospholipides .....	4
1.4 Sphingolipides .....	7
1.5 Prénols .....	9
1.6 Stérols .....	9
1.7 Saccharolipides .....	10
1.8 Polycétides .....	11
2 La préparation de l'échantillon .....	12
2.1 Extraction liquide-liquide .....	14
2.1.1 Principe général .....	14
2.1.2 Extraction liquide-liquide appliquée aux lipides .....	15
2.2 Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction : SPE) .....	16
2.3 Extraction avec les fluides supercritiques et autres techniques en développement .....	19
3 Analyses des lipides .....	20
3.1 Les méthodes de séparation .....	20
3.1.1 Chromatographie en phase gazeuse .....	20
3.1.2 Chromatographie en phase liquide .....	21
3.2 La détection des lipides .....	29
3.2.1 Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et le détecteur à aérosol chargé .....	29
3.2.2 La spectrométrie de masse .....	30
4 De l'analyse des lipides à la lipidomique .....	44
4.1 Les biomarqueurs .....	44
4.2 Les sciences « omiques » .....	46
4.3 Traitement des données des analyses lipidomiques .....	49
4.3.1 Particularités des données obtenues en chromatographie couplée à la spectrométrie de masse .....	50

4.3.2	Le prétraitement des données LC-MS.....	52
4.3.3	Les analyses chimiométriques.....	56
4.4	Identification des ions pseudo-moléculaires utilisant les données de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	63
<b>Chapitre 2 : Présentation du travail de thèse.....</b>		<b>66</b>
1	Contexte biologique de l'étude.....	67
2	Contexte méthodologique et analytique de l'étude.....	69
2.1	Analyse lipidomique et interdisciplinarité.....	69
2.2	Aspects méthodologiques et analytiques du couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse ultra-haute résolution.....	71
2.3	Aspect méthodologique de l'identification des composés lipidiques.....	75
3	Etude de l'impact du prétraitement sur les résultats des analyses discriminantes.....	77
4	Etude lipidomique descriptive de différents types de macrophages.....	77
5	Etude de l'impact de l'incorporation d'acide gras $\omega_3$ sur les phospholipides de macrophages humains et mise en relation avec la diminution d'efflux du cholestérol.....	78
6	Etude de l'impact de l'incorporation d'acide gras $\omega_3$ sur les phospholipides de macrophages humains spumeux et identification des mécanismes biochimiques de la diminution d'efflux du cholestérol.....	78
<b>Chapitre 3 : Etude de l'impact du prétraitement sur les résultats des analyses discriminantes.....</b>		<b>80</b>
1	Introduction.....	82
1.1	Nomenclature of lipids.....	82
1.2	Lipidomic studies, features for structural molecular identification.....	83
1.3	DoEs role in HPLC, software, and mass spectrometry.....	84
1.4	Biological impact of PUFA.....	85
2	Materials et methods.....	86
2.1	Chemicals.....	86
2.1.1	Standards.....	86
2.1.2	Solvents.....	86
2.2	J774 murine macrophage culture and extraction of phospholipids.....	86
2.3	LC-MS analysis procedure.....	87

2.4	Optimizing LC-MS pretreatment and data analysis.....	87
2.4.1	Pretreatment with MZmine: .....	87
2.4.2	Design of experiment (DoE): parameters and responses.....	89
2.5	Data analysis.....	89
3	Results .....	90
3.1	Optimizing LC-MS data pretreatment .....	90
3.1.1	Descriptive statistics and ANOVA test.....	91
3.1.2	Variables count.....	91
3.1.3	Discriminant variables count.....	92
3.1.4	Species Count .....	92
3.2	Application of chemometrics analysis of LC-MS data obtained from J774 murine cell phospholipids .....	93
3.2.1	Chemometric analysis .....	93
3.2.2	Identification of variables of interest .....	93
4	Discussion .....	94
5	Conclusion .....	96

**Chapitre 4 : Etude lipidomique descriptive de différents types de macrophages ..... 110**

1	Introduction.....	111
2	Matériel et méthodes.....	113
2.1	Culture cellulaire .....	113
2.2	Produits chimiques.....	114
2.2.1	Standards.....	114
2.2.2	Solvants .....	114
2.3	Extraction des lipides et préparation des acides gras méthylés .....	115
2.4	Analyses GC/MS des acides gras méthylés .....	115
2.5	Analyses des phospholipides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	115
2.5.1	Chromatographie liquide et analyse quantitative des classes lipidiques.....	115
2.5.2	Spectrométrie de masse.....	116
3	Résultats.....	116
3.1	Analyses GC-MS de la composition des phospholipides membranaires.....	116
3.1.1	Evaluation de l'extraction en phase solide des phospholipides.....	116

3.1.2	Développement de la méthode de chromatographie en phase gazeuse des acides gras méthylés .....	120
3.1.3	Linéarité, limite de détection, étalon interne .....	129
3.1.4	Synthèse des acides gras méthylés pour les échantillons biologiques et traitement des données .....	130
3.1.5	Composition des échantillons biologiques.....	133
3.2	Quantification des différentes classes lipidiques.....	135
3.2.1	Chromatogramme et étalonnage.....	135
3.2.2	Analyse des échantillons biologiques, des interférences et des co-élutions.....	139
3.2.3	Quantification des classes phospholipidiques des échantillons biologiques.....	142
3.3	Etude comparative des profils lipidiques obtenus par LC-MS LTQ-Orbitrap™ des macrophages J774, THP1 et HMDM.....	143
3.3.1	Espèces lipidiques communes aux trois types de macrophages.....	146
3.3.2	Espèces lipidiques spécifiques d'un seul type de macrophage.....	155
3.3.3	Espèces lipidiques présentes chez deux types de macrophages .....	161
4	Discussion et conclusion.....	164

**Chapitre 5 : Etude de l'impact de l'incorporation d'acide gras  $\omega$ 3 sur les phospholipides de macrophages humains et mise en relation avec la diminution d'efflux du cholestérol .....** 170

1	Introduction.....	171
2	Matériel et méthodes.....	172
2.1	Culture cellulaire et mesure de l'efflux du cholestérol .....	172
2.2	Réactifs .....	172
2.2.1	Standards.....	172
2.2.2	Solvants .....	173
2.3	Extraction des lipides et préparation des acides gras méthylés .....	173
2.4	Analyse des acides gras méthylés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) .....	174
2.5	Analyse des phospholipides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	175
2.5.1	Chromatographie liquide et quantification des classes lipidiques.....	175
2.5.2	Spectrométrie de masse.....	175
2.6	Traitement des données .....	175
2.6.1	Analyses discriminantes .....	176

2.6.2	Relation entre la diminution de l'efflux radioisotopique du cholestérol en présence d'EPA et les modifications des profils lipidiques.....	176
3	Résultats.....	178
3.1	Analyses GC-MS de la composition des phospholipides membranaires.....	178
3.2	Analyse des données LC-MS-détecteur à aérosol chargé (CAD).....	179
3.3	Les analyses discriminantes.....	182
3.3.1	Analyses chimiométriques .....	182
3.3.2	Espèces moléculaires identifiées comme discriminantes .....	184
3.3.3	Modélisation et prédiction de l'efflux du cholestérol en fonction du pourcentage de surexpression des variables discriminantes .....	188
4	Discussion.....	194
5	Conclusion .....	206

**Chapitre 6 : Etude de l'impact d'acides gras polyinsaturés sur la composition des phospholipides de macrophages humains spumeux et identification des mécanismes biochimiques de la diminution d'efflux du cholestérol.....** 208

1	Etude de l'impact de l'incorporation d'acide gras $\omega$ 3 sur les phospholipides de macrophages humains spumeux .....	209
2	Matériel et méthodes.....	209
2.1	Cultures cellulaires .....	209
2.2	Réactifs et méthodes d'analyse.....	210
3	Résultats.....	211
3.1	Quantification des classes lipidiques par NP-LC-détecteur à aérosol chargé .....	211
3.2	Analyses chimiométriques NP-LC-LTQ-Orbitrap™ .....	212
3.2.1	Identification des espèces lipidiques responsables des différences observées entre les cellules témoins et les cellules surchargées en cholestérol .....	215
3.2.2	Identification des espèces lipidiques responsables des différences observées entre les cellules surchargées en cholestérol et les cellules surchargées en cholestérol en présence d'EPA. ....	217
3.2.3	Modélisation de l'efflux du cholestérol en fonction du pourcentage de surexpression des variables discriminantes .....	219

**Chapitre 7 : Phospholipides oxydés : généralités, étude préliminaire.....** 264

1	Généralités .....	265
2	Analyses des phospholipides oxydés en chromatographie liquide à polarité de phases normale... .....	269
2.1	Matériel et méthodes.....	269
2.1.1	Standards.....	269
2.1.2	Solvants .....	270
2.1.3	Protocole d'oxydation des phospholipides .....	270
2.1.4	Chromatographie liquide et spectrométrie de masse .....	270
2.2	Résultats .....	270
2.2.1	Standards monomoléculaires.....	270
2.2.2	Standards naturels.....	276
2.3	Conclusion .....	279
	<b>Conclusion générale.....</b>	<b>282</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>286</b>
1	Annexes 1 : Composition des macrophages de Souris J774.....	287
1.1	Etude des phosphatidylcholines.....	287
1.2	Etude des phosphatidyléthanolamines .....	289
1.3	Etude des phosphatidylsérines.....	290
1.4	Etude des phosphatidylinositols.....	291
1.5	Etude des cardiolipines .....	292
1.6	Etude des phosphatidylglycerols.....	293
1.7	Etude des sphingomyélines.....	294
2	Annexe 2 : Composition des macrophages THP1.....	295
2.1	Etude des phosphatidylcholines.....	295
2.2	Etude des phosphatidyléthanolamines .....	297
2.3	Etude des phosphatidylsérines.....	298
2.4	Etude phosphatidylinositols .....	299
2.5	Etude des cardiolipines .....	300
2.6	Etude des phosphatidylglycérols et acides phosphatidiques.....	301
2.7	Etude des sphingomyélines.....	302
2.8	Etude des hexosylceramides et gangliosides .....	303

3	Annexe 3 : Composition des macrophages Humains ou HMDM .....	304
3.1	Etude des phosphatidylcholines.....	304
3.2	Etude des phosphatidyléthanolamines .....	305
3.3	Etude des phosphatidylsérines.....	306
3.4	Etude des phosphatidylinositols.....	307
3.5	Etude des cardiolipines .....	308
3.6	Etude des phosphatidylglycérols.....	309
3.7	Etude des sphingomyélines.....	310
3.8	Etude des gangliosides .....	311

# Liste des figures

---

Figure 1 : Exemples des différentes nomenclatures concernant les acides gras.....	2
Figure 2 : Structures des différentes classes de glycérolipides.....	4
Figure 3 : Différentes structures des phospholipides.....	5
Figure 4 : Exemple de structures d'un alkyl-acyl phospholipide (A) et structure d'un alkényl-acyl phospholipide (B).....	6
Figure 5 : Structures des phosphatidylglycérolphosphate, cardiolipine et phosphatidylinositol phosphorylés.....	7
Figure 6 : Biosynthèse et catabolisme des sphingolipides et maladies génétiques associées <sup>9</sup> .....	8
Figure 7 : Structures de quelques prényls.....	9
Figure 8 : Structure du Cholest-5-en-3-ol; (3 $\beta$ )-Cholest-5-en-3-ol ou Cholestérol.....	10
Figure 9 : Structure d'un saccharolipide, exemple Kdo2-lipide A.....	11
Figure 10 : Exemple de structure de trois polycétides.....	11
Figure 11 : Gamme de polarité des lipides et quelques solvants utilisés en chromatographie liquide placés sur l'échelle de polarité d'Hildebrand <sup>23</sup> .....	13
Figure 12 : Les étapes de l'extraction liquide-liquide.....	15
Figure 13 : Principe général de la préparation de l'échantillon utilisant la technique d'extraction en phase solide.....	17
Figure 14 : Arbre de décision de l'utilisation de colonne SPE en fonction des propriétés physico-chimiques des échantillons <sup>51</sup> .....	18
Figure 15 : Fractionnement des classes lipidiques en utilisant des colonnes amino-propyle <sup>57</sup> .....	19
Figure 16 : Paramètres de solubilité ( $\delta$ ) des phases stationnaires ( $\delta_s$ ), des lipides ( $\delta_A$ ) et des phases mobiles ( $\delta_M$ ) <sup>23</sup> .....	21
Figure 17 : Schématisation des interactions entre différentes classes de lipides et les phases stationnaires polaires utilisées en chromatographie en phase normale.....	23
Figure 18 : Schématisation des interactions entre différentes classes de lipides et les phases stationnaires apolaires utilisées en chromatographie à polarité de phases inversée.....	24
Figure 19 : Schéma et principe de fonctionnement des détecteurs (A) évaporatifs à diffusion de la lumière et (B) à aérosol chargé.....	30
Figure 20 : Schéma d'un spectromètre de masse.....	30
Figure 21 : Schéma d'une source d'ionisation à impact électronique <sup>164</sup> .....	31
Figure 22 : Schéma d'une source d'ionisation à impact électronique <sup>164</sup> .....	32
Figure 23 : Principe de l'électronébulisation <sup>164</sup> .....	33
Figure 24 : Domaine d'utilisation des principales sources d'ionisation utilisées en couplage GC-MS et LC-MS <sup>181,182</sup> .....	34
Figure 25 : Schéma d'un analyseur quadripolaire.....	36
Figure 26 : Principe d'analyseur triple quadripolaire <sup>189</sup> .....	37
Figure 27 : Principe de fonctionnement d'un analyseur à temps de vol <sup>189</sup> .....	39
Figure 28 : Principe d'un analyseur à temps de vol équipé d'un réflectron <sup>164</sup> .....	40
Figure 29 : Principe d'un analyseur de masse à résonance cyclotronique <sup>189</sup> .....	41
Figure 30 : Coupe transversale d'une cellule Orbitrap <sup>TM</sup> 207.....	42

Figure 31 : Schéma d'un LTQ-Orbitrap® .....	43
Figure 32 : Les différents types de biomarqueurs utilisables en médecine humaine mise en relation avec le processus de cancérogenèse de cellules coliques <sup>214</sup> .....	45
Figure 33 : Différents niveaux des sciences « omiques » ainsi qu'un ordre de grandeur du nombre d'espèces dans chaque classe <sup>217</sup> .....	46
Figure 34 : Représentation schématique des différentes stratégies utilisées en métabolomique et la quantité de biomarqueurs potentiellement mise en évidence <sup>217</sup> .....	48
Figure 35 : Les différentes étapes d'une étude lipidomique et les objectifs de la chimométrie .....	49
Figure 36 : Représentation en 3 dimensions des données LC-MS et de la notation matricielle obtenue après prétraitement <sup>229</sup> .....	51
Figure 37 : Les différentes étapes nécessaires au prétraitement des données LC-MS <sup>233</sup> .....	52
Figure 38 : Principe de la décomposition matricielle de la matrice de X lors d'une analyse en composantes principales (la notation « ' » représente la matrice transposée) .....	57
Figure 39 : Illustration de la différence entre PLS-DA et OPLS-DA <sup>251</sup> .....	61
Figure 40 : Représentation S-plot d'un modèle obtenu en OPLS-DA, d'après <sup>256</sup> le cadre tracé en rouge figurant la zone où se situent les variables discriminantes.....	62
Figure 41 : Analyse d'un mélange de standards de phospholipide détecté par Corona (A) et spectrométrie de masse (B) .....	73
Figure 42 : Différentes parties du travail de thèse.....	79
Figure 43 : Stratégie analytique adoptée .....	79
Figure 44 : Chromatogrammes obtenus après analyse des différentes fractions ; (A) solution mère, (B) percolât, (C) fraction obtenue après élution du volume de chloroforme, (D) fraction obtenue après élution de la phase diéthyléther/acide acétique (98 : 2; v/v), (E) fraction obtenue après élution de la phase chloroforme/ méthanol (6 : 1; v/v) et (F) fraction obtenue après élution de la phase chloroforme/ méthanol (6 : 1; v/v) avec 0,05mol.L <sup>-1</sup> d'acétate de sodium .....	119
Figure 45 : Les agents de dérivatisation pour l'analyse des acides gras en chromatographie en phase gazeuse <sup>316</sup> .....	121
Figure 46 : Spectre de masse du méthyle palmitate obtenu après impact électronique.....	123
Figure 47 : Spectre de masse du méthyle palmitoleate obtenu après impact électronique.....	124
Figure 48 : Spectre de masse d'un acide gras polyinsaturé (C20:5) obtenu en impact électronique (A) et en ionisation chimique utilisant le méthane comme gaz réactant (B) .....	125
Figure 49 : Chromatogramme du FAME 37 réalisé à partir du programme du four initial (1) et de la méthode définitive (2).....	127
Figure 50 : Chromatogrammes du FAME 37 après dilution à 5 % (A) et 13 % (B).....	129
Figure 51 : Chromatogramme d'un mélange de standard de phospholipides (0,5 g.L <sup>-1</sup> ) obtenus à partir du détecteur à aérosol chargé (CAD) .....	135
Figure 52 : Droite d'étalonnage des différentes classes phospholipidiques.....	137
Figure 53 : Chromatogrammes obtenus en détection Corona d'un contrôle qualité de standards de phospholipides (A), d'un échantillon biologique d'extrait de macrophages J774 (B), de THP1 (C) et de HMDM (D) .....	140
Figure 54 : Courant ionique total d'un échantillon de THP1 (A) et HMDM (B). Pour les THP1, le spectre de masse correspondant au temps de rétention 10,7-11,6 montre des hexasylcéramides (1a) et des cardiolipines (1b). Pour les HMDM, les spectres de masse (1) représentent les espèces de gangliosides et (2) représente les impuretés correspondant aux temps de rétention des LPC .....	142

Figure 55 : Pourcentage de différentes classes lipidiques exprimées en mg de lipides par mg de protéines quantifiables par détection Corona .....	143
Figure 56 : Courant ionique total d'un standard de phospholipides (A) d'un extrait de J774 (B), de THP1 (C) et de HMDM (D) .....	144
Figure 57 : Phosphatidylcholines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire .....	147
Figure 58 : Phosphatidyléthanolamines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire .....	149
Figure 59 : Phosphatidylinositols communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire .....	151
Figure 60 : Phosphatidylsérines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire .....	152
Figure 61 : Cardiolipines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire .....	153
Figure 62 : Sphingomyélines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire .....	154
Figure 63 : Analyses en composante principale des données NP-LC-LTQ-Orbitrap™ des extraits de macrophages HMDM, THP1 et J774.....	167
Figure 64 : Profil chromatographique obtenu à partir d'un mélange de phospholipides en utilisant une détection Corona.....	180
Figure 65 : Composition relative des différentes classes de phospholipides obtenus par NP-LC Corona entre les cellules témoins (T) et les cellules supplémentées par 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'EPA (EPA).....	181
Figure 66 : Tracé des scores après une analyse en composante principale (ACP) des profils LC-MS obtenus du DS1 .....	182
Figure 67 : Tracé des scores des échantillons de macrophages témoins et des macrophages-EPA après PLS-DA (A), OSC-PLS-DA (B) et S-plot correspondant (C) .....	183
Figure 68 : Niveau moyen des intensités des ions observées en spectrométrie de masse pour les PI (A), diacyl-PE et PS (B), les éthers-PE (C) et les PC (D et E) considérées comme discriminantes.....	187
Figure 69 : Tracé des Y prédits en fonction des Y expérimentaux pour M1 (A) et M2 (B).....	190
Figure 70 : (A) Coefficients centrés réduits des différentes variables du Modèle 2 (B) VIP des variables du Modèle PLS 2, (C) Coefficients centrés réduits des variables ayant des VIP supérieures à 1 et des coefficients significatifs .....	191
Figure 71 : (A) Tracé des scores du DS1 et DS2 avant correction et (B) tracé des scores du DS1 et DS2 après correction .....	192
Figure 72 : Tracé des Y observés en fonction des Y prédits pour le DS2.....	193
Figure 73 : Structure générale d'un phosphatidylinositol et les phosphoinositides correspondants	205
Figure 74 : Composition relative des différentes classes phospholipidiques obtenues par NP-LC-Corona entre les cellules témoins, les cellules surchargées en cholestérol (LDL) et les cellules surchargées en cholestérol et supplémentées avec de l'EPA 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	212
Figure 75 : (A) Tracé des scores de l'analyse en composante principale des échantillons correspondant aux cellules témoins (T), cellules surchargées en cholestérol (LDL) et celles incubées en présence d'EPA et de LDLac (EPA/LDL) EPA et LDL-cholestérol, (B) Tracé des scores des échantillons T, LDL, EPA/LDL analysé en PLS-DA, (C) Tracé des scores des échantillons témoins et LDL suivant le modèle d'OSC-PLS-DA, (D) Tracé du diagramme de variance-covariance correspondant au modèle témoins <i>versus</i> LDL analysé en OSC-PLS-DA, (E) Tracé des scores des échantillons LDL et	

EPA/LDL suivant le modèle d'OSC-PLS-DA, (F) Tracé du diagramme de variance-covariance correspondant au modèle LDL <i>versus</i> EPA/LDL analysé en OSC-PLS-DA .....	214
Figure 76 : (A) Cardiolipines, (B) PI, PE, PS et GM3, (C) PC considérées comme discriminantes dans le modèle Témoins <i>versus</i> LDL .....	216
Figure 77 : (A) CL, (B) PE, (C) DiacylPC, (D) DiacylPC ayant une intensité inférieure à 4,0 E+05, (E) PE et (F) éther lipides considérées comme discriminantes dans le modèle Témoins <i>versus</i> LDL.....	218
Figure 78 : Niveaux d'efflux du cholestérol entre les macrophages surchargés en cholestérol (LDL) et les macrophages surchargés en cholestérol en présence de 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'EPA (EPA/LDL).....	219
Figure 79 : Nombre de publications sur la thématique des lipides oxydés, phospholipides oxydés, de la lipidomique et sur l'oxydation des lipides <sup>391</sup> .....	265
Figure 80 : Classification des phospholipides oxydés <sup>395</sup> .....	266
Figure 81 : Effets des phospholipides oxydés sur les réactions inflammatoires menant à l'athérosclérose.....	267
Figure 82 : Chromatogramme du POVPC obtenu en détection Corona (A) et le spectre de masse correspondant (B).....	271
Figure 83 : Profils chromatographiques d'un mélange équimoléculaire de PC (18:3/18:3) PC (20:4/20:4) et PC (22:6/22:6) observés en détection Corona (A) et en courant ionique total (E) et profils chromatographiques des échantillons obtenus après oxydation observés en détection Corona et en courant ionique total respectivement de PC (18:3/18:3) : (B et F) ; PC (20:4/20:4) : (C et G) et PC (22:6/22:6) : (D et H) .....	273
Figure 84 : Spectre de masse d'un mélange équimolaire de PC (18:3/18:3), PC (20:4/20:4) et PC (22:6/22:6) (A) ; spectre de masse des échantillons obtenus après oxydation de PC (18:3/18:3) : (B) ; PC (20:4/20:4) : (C) et PC (22:6/22:6) : (D).....	275
Figure 85 : Chromatogramme d'un mélange de phospholipides (A), spectre de masse correspondant aux PI natifs (B), chromatogramme d'un échantillon de PI oxydés obtenu avec l'AAPH (C), spectre de masse correspondant à la fenêtre d'élution 11,8-13 minutes (D), chromatogramme d'un échantillon de PI oxydés obtenu avec HOCl (E), spectre de masse correspondant à la fenêtre d'élution 11,8-13 minutes (F).....	277
Figure 86 : Comparaison des spectres de masse des différentes classes de phospholipides avant oxydation (A) et après traitement à l'AAPH (B) .....	278
Figure 87 : Spectre de masse des phosphatidylcholines de macrophages J774.....	287
Figure 88 : Spectre de masse des phosphatidylethanolamines de macrophages J774 .....	289
Figure 89 : Spectre de masse des phosphatidylsérines de macrophages J774.....	290
Figure 90 : Spectre de masse des phosphatidylinositols de macrophages J774.....	291
Figure 91 : Spectre de masse des cardiolipines de macrophages J774.....	292
Figure 92 : Spectre de masse des phosphatidylglycerols de macrophages J774 .....	293
Figure 93 : Spectre de masse des sphingomyélines de macrophages J774 .....	294
Figure 94 : Spectre de masse des phosphatidylcholines de macrophages THP1.....	295
Figure 95 : Spectre de masse des phosphatidylethanolamines de macrophages THP1.....	297
Figure 96 : Spectre de masse des phosphatidylsérines de macrophages THP1.....	298
Figure 97 : Spectre de masse des phosphatidylinositols de macrophages THP1.....	299
Figure 98 : Spectre de masse des cardiolipines de macrophages THP1 .....	300
Figure 99 : Spectre de masse des phosphatidylglycerols de macrophages THP1.....	301
Figure 100 : Spectre de masse des sphingomyélines de macrophages THP1.....	302

Figure 101 : Spectre de masse des hexosylcéramides (A) et des gangliosides (B) de macrophages THP1 .....	303
Figure 102 : Spectre de masse des phosphatidylcholines de macrophages HMDM .....	304
Figure 103 : Spectre de masse des phosphatidylethanolamines de macrophages HMDM.....	305
Figure 104 : Spectre de masse des phosphatidylsérines de macrophages HMDM .....	306
Figure 105 : Spectre de masse des phosphatidylinositols de macrophages HMDM .....	307
Figure 106 : Spectre de masse des cardiolipines de macrophages HMDM .....	308
Figure 107 : Spectre de masse des phosphatidylglycerols de macrophages HMDM.....	309
Figure 108 : Spectre de masse des sphingomyélines de macrophages HMDM.....	310
Figure 109 : Spectre de masse des gangliosides de macrophages HMDM .....	311

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Résolution, gamme maximale et exactitude en masse de principaux analyseurs en spectrométrie de masse.....	35
Tableau 2 : Différents types de biomarqueurs selon l'Organisation mondiale de la santé.....	45
Tableau 3 : Représentation générale des données chimiques .....	50
Tableau 4 : Différentes étapes du prétraitement disponibles sur Mzmine avec les différents algorithmes disponibles .....	55
Tableau 5 : Différentes méthodes de mise à l'échelle utilisées pour le traitement chimiométrique des données, $x$ représente les données brutes, $\tilde{x}$ représente les données transformées et $s$ l'écart type <sup>248</sup> .....	59
Tableau 6 : Gradient linéaire utilisé pour la séparation chromatographique des phospholipides.....	71
Tableau 7 : Paramètres utilisés sur l'API 3000 lors des études Full-Scan (unité arbitraire).....	72
Tableau 8 : Proportions relatives des acides gras contenus dans le sérum de veau fœtal utilisé dans les cultures cellulaires .....	114
Tableau 9 : Protocole utilisé lors de l'évaluation de la méthode de purification de phospholipides.	118
Tableau 10 : Composition du standard d'acides gras méthylés (FAME 37 Supelco®) abrégations utilisées, et masse des acides gras méthylés .....	122
Tableau 11 : Comparaison des temps de rétention des acides gras méthylés du standard FAME Supelco® obtenus à partir de deux méthodes de chromatographie en phase gazeuse.....	128
Tableau 12 : Linéarité et répétabilité de la méthode de séparation des acides gras méthylés.....	130
Tableau 13 : Proportions des différents acides gras des membranes cellulaires de J774, THP1 et HMDM .....	134
Tableau 14 : Données complémentaires de l'étalonnage des classes phospholipidiques.....	138
Tableau 15 : Synthèse du nombre d'ions identifiés par classe lipidique et par type de macrophages .....	145
Tableau 16 : Espèces lipidiques uniquement retrouvées chez les J774.....	156
Tableau 17 : Espèces lipidiques uniquement retrouvées chez les THP1.....	158
Tableau 18 : Espèces lipidiques uniquement retrouvées chez les HMDM .....	160
Tableau 19 : Espèces phospholipidiques uniquement présentes dans les extraits de macrophages J774 et THP1.....	162
Tableau 20 : Espèces lipidiques uniquement présentes dans les extraits de macrophages THP1 et HMDM .....	163
Tableau 21 : Espèces phospholipidiques uniquement présentes dans les extraits de macrophages J774 et HMDM.....	164
Tableau 22 : Proportion des différents acides gras des PL membranes des HMDM témoins (T) et HMDM-EPA (EPA).....	179
Tableau 23 : Coordonnées des variables identifiées dans le modèle cellules témoins <i>versus</i> EPA considérées comme discriminantes.....	184
Tableau 24 : Efflux radioisotopique du cholestérol (4h) en présence de 15 µg/mL d'ApoA1 mesuré au cours des différentes expériences chez les cellules T et cellules EPA.....	188
Tableau 25 : Caractéristiques des paramètres de validation des modèles M1 et M2.....	189

Tableau 26 : Ecart observé entre les valeurs prédites et les valeurs observées expérimentalement de l'efflux du cholestérol.....	193
Tableau 27 : Coordonnées des variables identifiées dans le modèle cellules témoins <i>versus</i> LDL considérées comme discriminantes.....	215
Tableau 28 : Coordonnées des variables identifiées dans le modèle LDL <i>versus</i> EPA/LDL considérées comme discriminantes .....	217
Tableau 29 : Identification des ions de phosphatidylcholines de macrophages J774 .....	288
Tableau 30 : Identification des ions de phosphatidylethanolamines de macrophages J774.....	289
Tableau 31 : Identification des ions de phosphatidylsérines de macrophages J774 .....	290
Tableau 32 : Identification des ions de phosphatidylinositols de macrophages J774 .....	291
Tableau 33 : Identification des ions de cardiolipines de macrophages J774 .....	292
Tableau 34 : Identification des ions de phosphatidylglycerols de macrophages J774 .....	293
Tableau 35 : Identification des ions de sphingomyélines de macrophages J774.....	294
Tableau 36 : Identification des ions de phosphatidylcholines de macrophages THP1 .....	296
Tableau 37 : Identification des ions de phosphatidylethanolamines de macrophages THP1 .....	297
Tableau 38 : Identification des ions de phosphatidylsérines de macrophages THP1 .....	298
Tableau 39 : Identification des ions de phosphatidylinositols de macrophages THP1 .....	299
Tableau 40 : Identification des ions de cardiolipines de macrophages THP1 .....	300
Tableau 41 : Identification des ions de phosphatidylglycerols et acide phosphatidique de macrophages THP1.....	301
Tableau 42 : Identification des ions de sphingomyélines de macrophages THP1 .....	302
Tableau 43 : Identification des ions de hexosylcéramides et des gangliosides de macrophages THP1 .....	303
Tableau 44 : Identification des ions de phosphatidylcholines de macrophages HMDM.....	304
Tableau 45 : Identification des ions de phosphatidylethanolamines de macrophages HMDM .....	305
Tableau 46 : Identification des ions de phosphatidylsérines de macrophages HMDM.....	306
Tableau 47 : Identification des ions de phosphatidylinositols de macrophages HMDM.....	307
Tableau 48 : Identification des ions de cardiolipines de macrophages HMDM.....	308
Tableau 49 : Identification des ions de phosphatidylglycerols de macrophages HMDM .....	309
Tableau 50 : Identification des ions de sphingomyélines de macrophages HMDM .....	310
Tableau 51 : Identification des ions de gangliosides de macrophages HMDM .....	311

# Liste des équations

---

Équation 1 : Formule du facteur de capacité en chromatographie d'adsorption proposé par Snyder et Soczewinski.....	22
Équation 2 : Loi de Darcy (L : longueur de la colonne, u : vitesse linéaire de la phase mobile, dp : diamètre des particules, $\eta$ : viscosité de la phase mobile) .....	26
Équation 3 : Relation entre l'efficacité (N), la longueur de la colonne (L) et le diamètre des particules (dp) contenues dans la colonne chromatographique .....	27
Équation 4 : Equation de van Deemter (HEPT : hauteur équivalente des plateaux théorique ; A : diffusion turbulente ; B : dispersion moléculaire longitudinale ; C : résistance au transfert de masse et u : vitesse linéaire de la phase mobile) .....	27
Équation 5 : Exactitude en masse (Mexp : masse expérimentale ; Mth : masse théorique) en partie par million (ppm).....	35
Équation 6 : Equation en fonction du temps du mouvement axial des ions en mouvement dans l'Orbitrap™ (z(0) : amplitude axiale ; Ez : énergie cinétique de l'ion ; q : charge de l'ion ; m : masse de l'ion).....	42
Équation 7 : Expression de la résolution d'un analyseur Orbitrap™ .....	43
Équation 8 : Expression de la variable Y sur la poche j et de la variable X de la poche j pour la variable discriminante i.....	177
Équation 9 : Formule de la RMSEE et de la RMSEP .....	177

# Liste des abréviations

---

AA : Acide arachidonique	LIPID-MAPS <sup>®</sup> : LIPID-Metabolites And Pathways Strategy
AAPH : 2,2'-Azobis 2-methylpropionamide	LOX : Lipoxygénase
ABCA1 : ATP-Binding Cassette Transporter A1	LT : leucotriènes
ACP : Analyse en composante principale	LTQ : Linear trap quadrupole
AG : Acides gras	MG : Monoglycérides
AGMI : Acides gras monoinsaturés	MGDG : Monogalactosyldiacylglycerol
AGPI : Acides gras polyinsaturés	MRM : Multiple Reaction Monitoring
AGS : Acides gras saturés	MS : Spectrométrie de masse
AO : Acide oléique	NARP : Non Aqueous Reversed Phase
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique	NP-LC : Chromatographie à polarité de phases normales
APLI : Atmospheric pressure laser ionization	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
APPI : Photoionisation à pression atmosphérique	OPLS-DA : Orthogonal Partial least square Discriminant Analysis
CAD : Détecteur à aérosol chargé	OSC : Orthogonal Signal Correction
CCM : Chromatographie liquide sur couche mince	OxPL : Phospholipide oxydé
CID : Collision induced dissociation	PA : Acide phosphatidique
CL : Cardiolipine	PAF : Platelet activating factor
COX : Cycloxygénase	PARP : Partial Aqueous Reversed Phase
CPG : Chromatographie en phase gazeuse	PC : Phosphatidylcholine
DEDL : Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière	PE : Phosphatidyléthanolamine
DG : Diglycérides	PG : Phosphatidylglycérol
DGDG : Digalactosyldiacylglycerol	PI : Phosphatidylinositol
DGLA : Acide dihomog- $\gamma$ -linoléique	PKA : Protéines Kinases A
DHA : Acide docosahexaénoïque	PL : Phospholipide
DPA : Acide docosapentaénoïque	PLS : Partial least square ou méthode des moindres carrés partiels
ECN : Nombre d'équivalent carbone	PLS-DA : Partial least square discriminant analysis
EPA : Acide eicosapentaénoïque	POVPC : 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
ESI : Electrospray	PQN : Probabilistic quotient normalization
FAME : Fatty acid methyl ester	PS : Phosphatidylsérine
FID : détecteur à ionization de flame	Qq-TOF : Quadripôle-Temps de vol
FT-ICR : Analyseur de masse à résonance cyclotronique à Transformée de Fourier	RMSEE : Root Mean Square Error of Estimation
GC-MS : Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse	RMSEP : Root Mean Square Error of Prediction
GM : Ganglioside	RP-LC : Chromatographie à polarité de phases inversée
HDL : High density lipoprotein	SIM : Single Ion Monitoring
HILIC : Chromatographie d'interaction hydrophile	SM : Sphingomyeline
HmCSF : Human macrophages stimulating factor	SPE : Solide Phase Extraction
HMDB : Human metabolome database	SVF : Serum de veau fœtal
HMDM : Human Monocytes Derived-Macrophages	TG : Triglycérides
LA : Acide linoléique	UHPLC : Chromatographie liquide à ultra-haute pression
LC-MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	VIP : Variable influence on the projection
LDL : Low density lipoprotein	



# **Chapitre I : Généralités**

**De la classification des lipides à l'analyse  
lipidomique**

# 1 Les lipides

Les lipides sont des constituants essentiels des êtres vivants. Ils sont souvent définis comme des espèces chimiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques<sup>1,2</sup>. Cette définition peut paraître réductrice au regard des propriétés de solubilité de certains lipides. En effet certains lipides possèdent une large partie hydrophile qui leur confère un caractère amphiphile marqué (glycolipides, isoprénoides)<sup>3,4</sup>.

Récemment, un système de classification a été élaboré en se basant sur les voies de biosynthèse des lipides<sup>5</sup>. Ils sont alors présentés comme de petites molécules hydrophobes ou amphiphiles provenant de la condensation de thioesters ou d'unités isoprènes. Les notions de lipides simples et lipides complexes ont été proposées. Les produits résultant de l'hydrolyse d'un lipide simple donnent au maximum deux produits distincts. Un lipide complexe quant à lui s'hydrolyse en trois produits différents. De nombreuses classifications ont été établies à partir des différentes définitions des lipides comme les voies de biosynthèse ou les propriétés physico-chimiques<sup>6,7</sup>.

Actuellement, la classification la plus utilisée est celle qui a été proposée par le consortium de LIPID-Metabolites And Pathways Strategy (LIPID-MAPS<sup>®</sup>)<sup>8</sup>. Elle est basée sur la biosynthèse des lipides. Deux groupes de lipides sont ainsi définis : le groupe des cétoacyls qui sont issus de la condensation d'unités thioesters (acides gras : AG, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, saccharolipides et polycétides) et le groupe des isoprènes (prénols et stérols), respectivement biosynthétisés à partir de carbanions et de carbocations. Les lipides sont classés en huit catégories : les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les polycétides, les saccharolipides ainsi que les prénols et les stérols. Ces catégories sont subdivisées en classes, sous-classes et espèces moléculaires<sup>9</sup>.

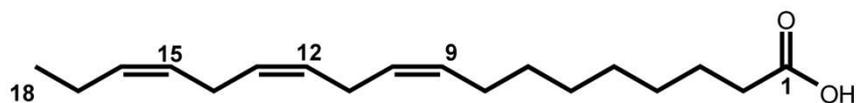
## 1.1 Les acides gras

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques (R-COOH) dont le radical R est une chaîne hydrocarbonée de quatre à trente-deux atomes de carbone. Elle peut être complètement saturée ou peut comprendre une ou plusieurs insaturations. Une nomenclature a été mise au point pour décrire le nombre d'atomes de carbone, le nombre et la position des insaturations. Elle s'écrit sous la forme C<sub>x</sub>:y ; x correspond au nombre d'atomes de carbone et y au nombre d'insaturations.

La position des insaturations peut être notée de deux façons : la première est en conformité avec la nomenclature internationale et se note  $\Delta^{a, b, \dots, n}$  ; chaque lettre indiquant la position des  $n$  insaturations. La seconde correspond à la nomenclature biochimique et se note «  $\omega : n$  ». Les carbones sont numérotés en partant du méthyle terminal et  $n$  correspond à la position de la première insaturation.

Par ailleurs, en chimie organique la présence d'une double liaison fait apparaître des isoméries de configuration. Cette diastéréoisomérie est basée sur la nomenclature de Cahn-Ingold-Prelog<sup>10</sup>. Les groupements fonctionnels de part et d'autre de la double liaison sont numérotés en fonction du numéro atomique des substituants. Si les substituants classés numéro 1 sont du même côté que la double liaison, la molécule est dite de configuration « Z », s'ils sont de part et d'autre de la double liaison, la molécule est dite de configuration « E ».

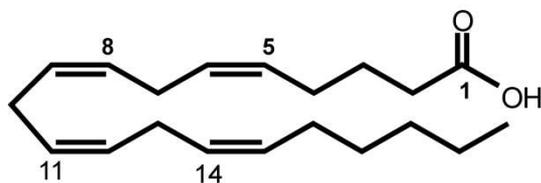
L'isomérie *cis* et *trans* est, quant à elle, basée sur l'encombrement stérique des groupements fonctionnels. Une molécule est dite *trans* si les substituants se trouvent de part et d'autre de la double liaison et une molécule est dite *cis* si les groupes prioritaires sont du même côté que la double liaison. Un composé *cis* n'est pas forcément Z, même si c'est très souvent le cas. Deux exemples d'acides gras et leurs différentes nomenclatures sont présentés Figure 1 : Exemples des différentes nomenclatures concernant les acides gras Figure 1.



### Acide $\alpha$ linoléinique

18 atomes de carbone, 3 doubles liaisons en position 9, 12 et 15.

Nomenclature correspondante : 9, 12, 15 *cis* acide linoléinique, C18,  $\Delta^{9,12,15}$  ou C18:3  $\omega$ -3.



### Acide arachidonique

20 atomes de carbone, 4 doubles liaisons en position 5, 8, 11, 14.

Nomenclature correspondante : 5Z, 8Z, 11Z, 14Z Acide Eicosatétraénoïque, C20,  $\Delta^{5,8,11,14}$  ou C20:4  $\omega$ -6.

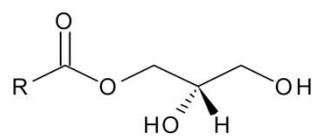
Figure 1 : Exemples des différentes nomenclatures concernant les acides gras

Les AG peuvent être apportés par l'alimentation ou synthétisés dans l'organisme. L'acide linoléique, C18:2  $\Delta^{(9,12)}$  ou (18:2 n-6 ou  $\omega 6$ ) et l'acide  $\alpha$ -linoléique, C18:3 (9,12,15) ou (18:3 n-3 ou  $\omega 3$ ) sont dits essentiels car il ne peuvent être apportés que par l'alimentation<sup>11</sup>. On les trouve principalement dans les huiles végétales (olive, tournesol, colza) ou dans certains aliments comme les noix. Les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique sont respectivement les précurseurs notamment de l'acide arachidonique (C20:4  $\Delta^{5,8,11,14}$ ) et de l'acide eicosapentaénoïque (C20:5  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ). Ces acides gras sont entre autres les précurseurs dans l'organisme de la classe des eicosanoïdes, qui sont des lipides oxydés pouvant être synthétisés selon trois voies enzymatiques : 1) la voie de la lipo-oxygénase à l'origine des leucotriènes et les acides hydroxyeicosatétraénoïques, 2) la voie de la cyclooxygénase aboutissant aux thromboxanes et aux prostaglandines, 3) la voie des cytochromes P-450 permettant la synthèse des acides hydroxyeicosatétraénoïques, époxyeicosatriénoïques et dihydroxyeicosatriénoïques<sup>12</sup>. Les eicosanoïdes sont des lipides qui ont de nombreuses fonctions dans l'organisme notamment dans l'inflammation, la contraction des muscles lisses, la régulation du métabolisme et de l'agrégation plaquettaire. Ils ont aussi un impact sur les maladies cardio-vasculaires et le diabète<sup>13-15</sup>.

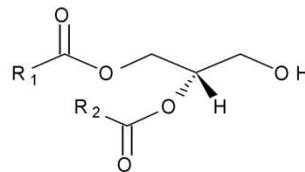
## 1.2 Glycérolipides

Les glycérolipides sont des esters du glycérol. Les trois carbones asymétriques du groupement glycérol sont numérotés de 1 à 3 (*sn* : stereospecific numbering). Les trois fonctions alcool du glycérol peuvent être soit toutes estérifiées par trois AG (triglycérides), soit estérifiées par deux AG (diglycérides) ou une seule fonction alcool est estérifiée par un unique AG (monoglycérides). D'autres classes de glycérolipides sont caractérisées par la présence de résidus sucre liés par une liaison osidique entre une fonction alcool du glycérol et une fonction alcool du sucre, formant par exemple des mono ou des digalactosyldiacylglycérols si le sucre est un galactose, Figure 2.

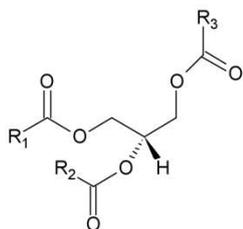
Dans l'organisme, les glycérolipides se retrouvent principalement dans la circulation ou sous forme de gouttelettes lipidiques dans les cellules. Cette classe lipidique est impliquée dans différentes fonctions comme la thermorégulation et le stockage d'énergie notamment<sup>16</sup>.



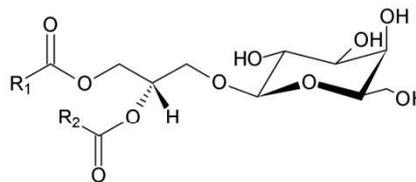
1-acyl-*sn*-glycérol : Monoglycérides (MG)



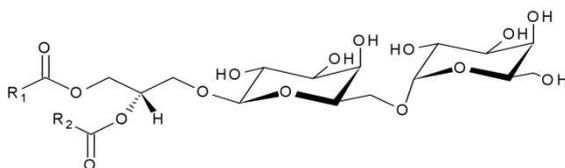
1,2-diacyl-*sn*-glycérol : Diglycérides (DG)



Triacyl-*sn*-glycérol : Triglycérides (TG)



1,2 diacyl-3-O- $\beta$ -D-galactosyl-*sn*-glycérol ou Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)

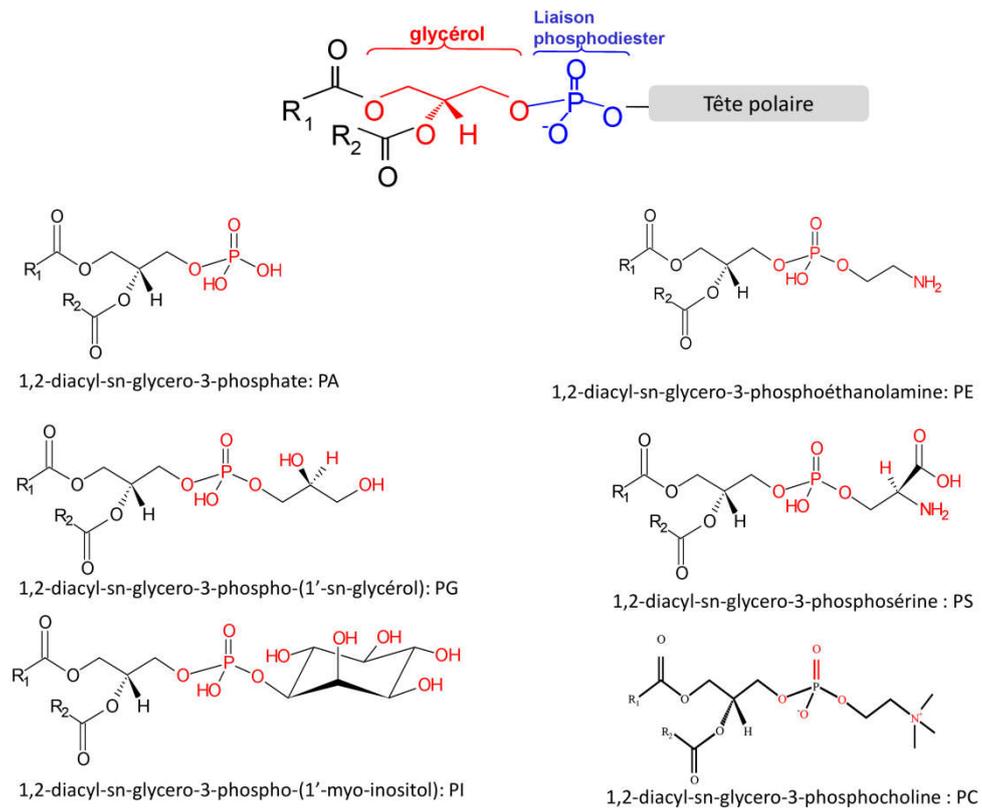


1,2 diacyl-3-O-( $\alpha$ -D-galactosyl1-6)- $\beta$ -D-galactosyl-*sn*-glycérol ou Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)

Figure 2 : Structures des différentes classes de glycérolipides

### 1.3 Glycérophospholipides

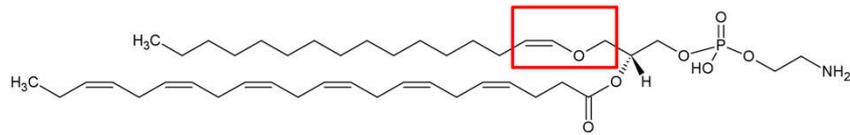
Les glycérophospholipides ou phospholipides (PL) ont pour structure commune le *sn*-glycérol 3 phosphate. Il existe une grande diversité structurale pour cette famille de molécules. En effet, la classe de phospholipides est définie par la nature de la tête polaire fixée sur le groupement hydroxyle du glycérol en position *sn*3. Ainsi, six classes de phospholipides peuvent être rencontrées : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycérols (PG) et l'acide phosphatidique (PA). Les différentes structures des têtes polaires des phospholipides sont présentées Figure 3.



**Figure 3 : Différentes structures des phospholipides**

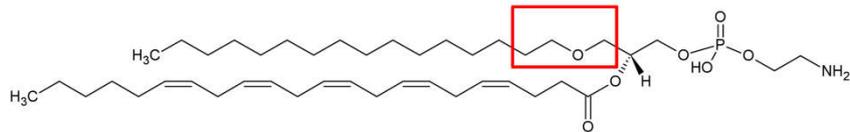
Les fonctions alcool en position *sn1* et *sn2* peuvent être estérifiées par deux acides gras : ce sont des diacyl-phospholipides. Pour les PC, PE et PI un alcool gras peut se fixer par une liaison éther (alkyl-PL) ou par une liaison vinyl éther (alkényl-PL ou plasmalogènes) sur les fonctions alcool en position *sn1* ou *sn2*, Figure 4.

(A)



1-O-(1Z-hexadecenyl)-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenyl)-sn-glycero-3-Phosphoethanolamine ou PE (P-16:0/22:6)

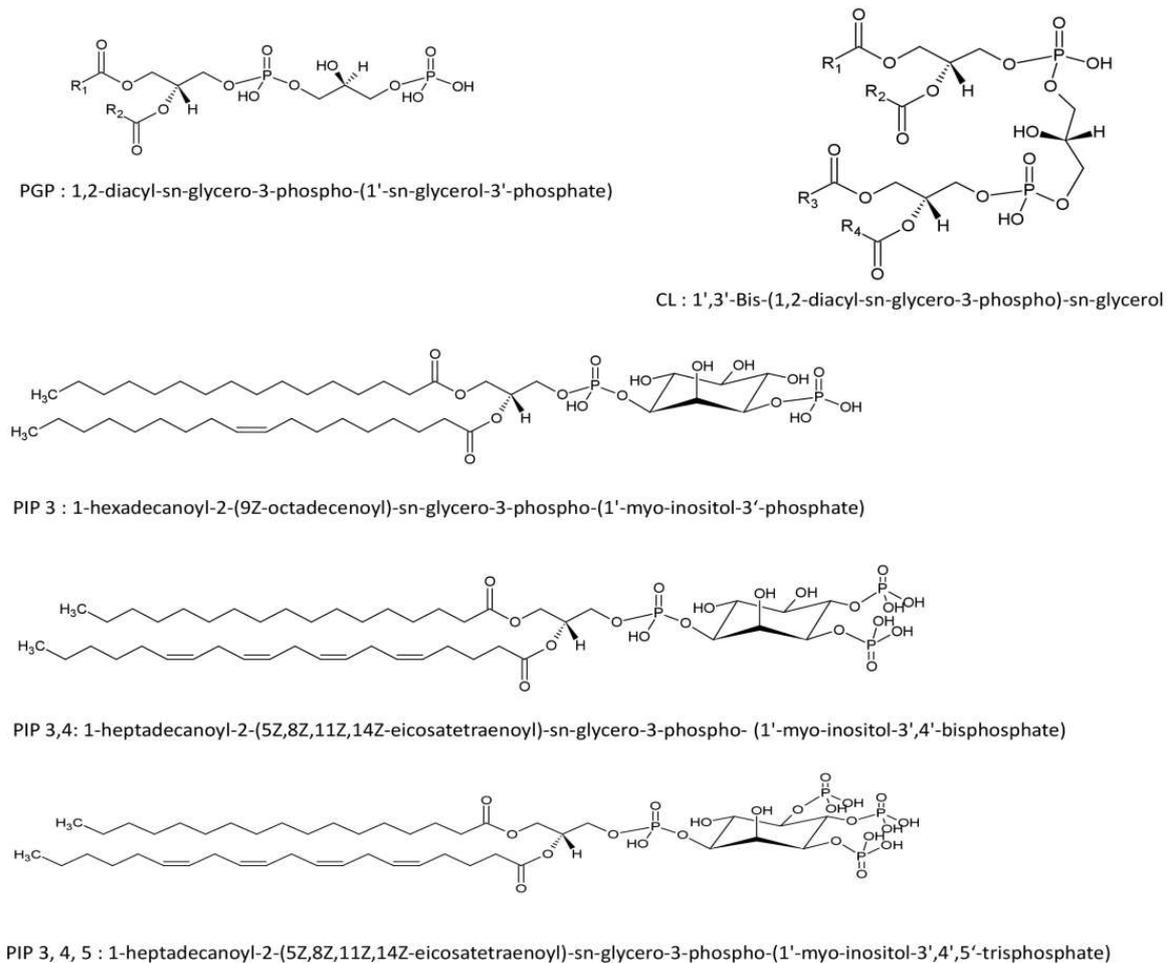
(B)



1-hexadecyl-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenyl)-sn-glycero-3-Phosphoethanolamine ou PE(O-16:0/22:5)

**Figure 4 : Exemple de structures d'un alkyl-acyl phospholipide (A) et structure d'un alkényl-acyl phospholipide (B)**

Pour certaines classes de PL, des résidus alcool peuvent être phosphorylés. C'est le cas par exemple de l'inositol des PI pouvant être phosphorylé en position 3, 4 et 5 ou du résidu glycérol des PG. Les glycérophosphoglycérophosphoglycérols (cardiolipines, CL) sont issus de la condensation de deux PG, Figure 5.



**Figure 5 : Structures des phosphatidylglycérolphosphate, cardiolipine et phosphatidylinositol phosphorylés**

Les PL sont les constituants essentiels des membranes cellulaires (cytoplasmiques et organites). Leur caractère amphiphile permet entre autre une organisation en bicouche assurant ainsi la cohésion de ces interfaces. Les PC sont les PL les plus abondants au sein des membranes cytoplasmiques. Il existe aussi lors de la biosynthèse des phospholipides une interconversion entre PC et PE, PE et PS. A l'évidence, les PL ont un rôle structural majeur mais peuvent aussi être impliqués dans des voies de transduction d'un signal et participer au fonctionnement des protéines insérées dans la membrane cellulaire<sup>17,18</sup>.

## 1.4 Sphingolipides

Les sphingolipides sont une catégorie de lipides comprenant une structure commune de type sphingoïde. Les bases sphingoïdes les plus répandues dans le monde animal sont la sphingosine et la sphinganine. Ces composés présentent une chaîne d'AG, deux fonctions hydroxyles et une fonction

amine. L'addition d'un AG sur la base sphingoïde grâce à la création d'une liaison amide permet de construire le squelette d'un céramide. A partir de ce squelette, l'addition d'un radical phosphocholine sur une fonction hydroxyle primaire permet de créer la structure de base d'une sphingomyéline (SM). Cette fonction hydroxyle peut aussi comporter des groupements osidiques divers. La condensation d'un céramide avec un ou plusieurs sucres donne naissance à un glycosphingolipide. La diversité de ces molécules se caractérise par la variabilité de la structure de la chaîne osidique qui s'ajoute à la variabilité sur des chaînes d'AG.

Les sphingolipides sont présents dans les membranes cellulaires et principalement au niveau du feuillet externe de la bicouche lipidique. Leur rôle dans la cellule a été particulièrement décrit et cette classe de lipide est impliquée dans la survenue d'une série de maladies génétiques qui impliquent leur catabolisme enzymatique. Ils sont aussi impliqués dans le phénomène d'apoptose, de différenciation et de reconnaissance cellulaire<sup>19-21</sup>, Figure 6.

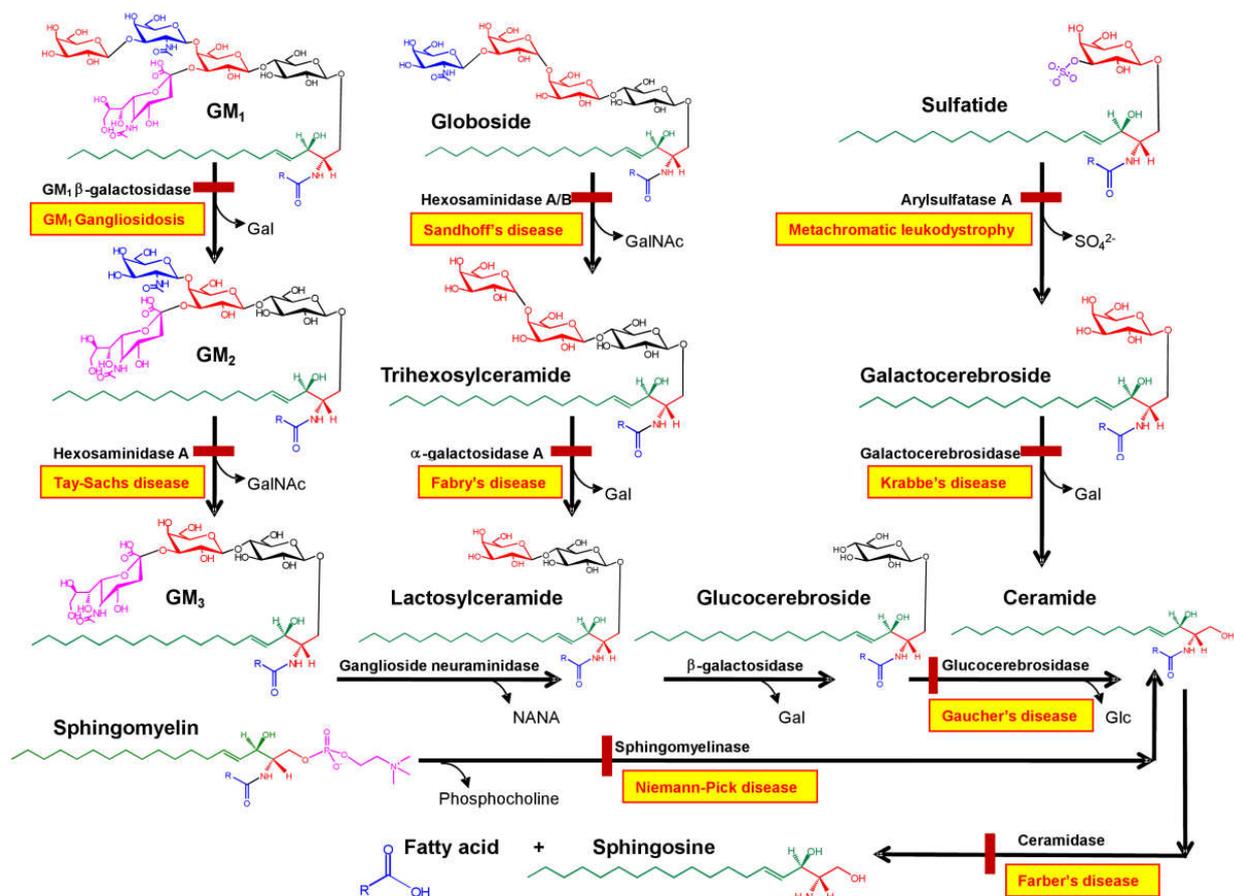


Figure 6 : Biosynthèse et catabolisme des sphingolipides et maladies génétiques associées<sup>9</sup>

## 1.5 Prénols

Les prénoles sont synthétisés à partir de précurseurs à cinq atomes de carbone, l'isopentényl-pyrophosphate et le diméthylallyl-pyrophosphate. Les différentes classes de prénoles se caractérisent par la longueur du squelette hydrocarboné et par leurs groupements fonctionnels. Les caroténoïdes sont des isoprénoïdes simples. Ils agissent comme des antioxydants et comme précurseurs de la vitamine A. Les quinones et les hydroxyquinones sont une autre classe de molécules qui contiennent une chaîne latérale isoprénique attachée à un noyau quinonoïde d'origine non isoprénique. La vitamine E et les vitamines K, ainsi que les ubiquinones en sont des exemples, comme le montre la Figure 7.

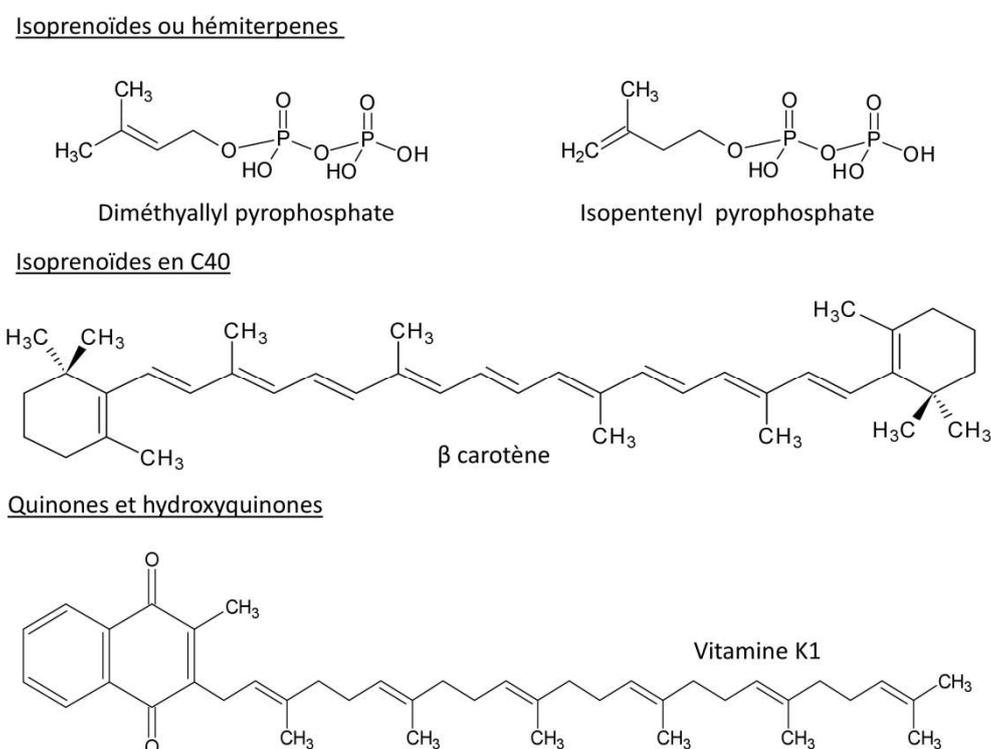


Figure 7 : Structures de quelques prénoles

## 1.6 Stérols

Les stérols possèdent une structure commune de type cyclopentanophénanthrène représentée Figure 8. Ce tétracycle confère à cette catégorie de lipides un caractère hydrophobe important. Le

cholestérol est le stérol le plus abondant chez les mammifères, majoritairement retrouvé à l'état non estérifié dans l'organisme. Par rapport à la structure commune, le cholestérol comporte deux fonctions méthyle en position 10 et 13, une fonction hydroxyle en position 3 et une double liaison en position 5, 6. Le cholestérol est un constituant majeur des membranes cellulaires. En s'intercalant entre les chaînes d'acides gras des PL, il contribue à la rigidification des membranes. Il est aussi le précurseur des hormones stéroïdiennes, de la vitamine D et des acides biliaires. Son métabolisme est soumis à de multiples régulations dont la perturbation est à l'origine de nombreuses pathologies, comme par exemple l'athérosclérose<sup>22</sup>.

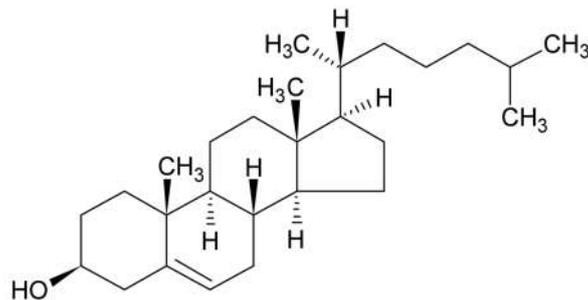


Figure 8 : Structure du Cholest-5-en-3-ol; (3β)-Cholest-5-en-3-ol ou Cholestérol

## 1.7 Saccharolipides

Ce sont des composés dont le squelette est constitué de chaînes osidiques. Les acides gras se greffent sur les parties hydroxyles ou amines résiduelles de la chaîne osidique. Par analogie aux glycérolipides ou phospholipides, le squelette glycérol est ici substitué par une chaîne osidique. Les saccharolipides les plus connus sont les précurseurs de glucosamines acylés composant le lipopolysaccharide des bactéries Gram négatif, Figure 9.

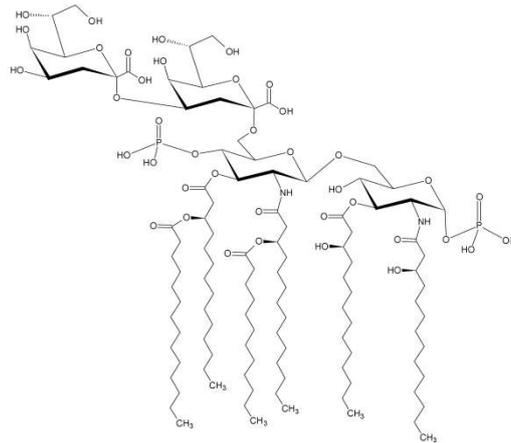
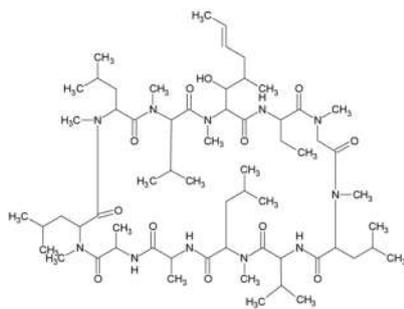


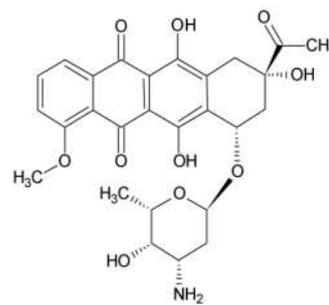
Figure 9 : Structure d'un saccharolipide, exemple Kdo2-lipide A

## 1.8 Polycétides

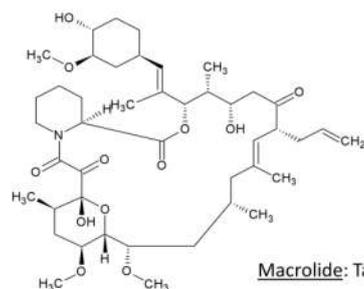
Les polycétides sont des molécules cycliques issues de la condensation successive de sous-unités acétyle et propionyle. Cette catégorie de lipides se répartit en trois classes principales : les macrolides, les polycétides aromatiques et les polycétides non ribosomiques. Les différents squelettes peuvent être modifiés par glycosylation, méthylation, hydroxylation ou par différents phénomènes d'oxydation. Les différentes structures des classes principales sont représentées Figure 10.



Polycétide non ribosomique: Cyclosporine A



Polycétide aromatique: Daunorubicine



Macrolide: Tacrolimus

Figure 10 : Exemple de structure de trois polycétides

Les polycétides représentent une famille très diverse de produits naturels possédant une activité pharmacologique. On dénombre les macrolides et les tétracyclines, qui sont des antibiotiques largement utilisés encore de nos jours, un immunosuppresseur (tacrolimus), un antifongique (amphotéricine B) ou encore des molécules cytostatiques (famille des anthracyclines).

Au travers de cette présentation rapide des différentes catégories de lipides, nous pouvons mesurer la diversité structurale des lipides qui est associée à une multiplicité des rôles biologiques. En effet, ces molécules peuvent avoir un rôle structural au niveau des membranes cellulaires, du métabolisme énergétique et de second messager dans les voies de transduction des voies de signalisation.

Cette diversité s'exprime notamment au niveau des squelettes des différentes catégories de lipides, de la longueur du nombre et de la position des insaturations des chaînes hydrocarbonées, de la nature de la tête polaire du squelette principal. Le consortium LIPID MAPS fait état de 40 000 structures référencées. De plus, il est établi qu'en fonction de l'espèce vivante étudiée, les proportions des différentes classes lipidiques peuvent varier qualitativement et quantitativement.

A l'évidence et au regard de la diversité structurale qui engendre des propriétés physicochimiques très différentes, à ce jour aucune technique analytique ne peut prétendre à l'analyse exhaustive des composés lipidiques d'un échantillon biologique. Ainsi, pour la caractérisation des espèces lipidiques présentes dans un milieu biologique, il est souvent nécessaire d'associer une technique de préparation de l'échantillon qui permet d'extraire une ou plusieurs fractions lipidiques d'un milieu complexe à une technique analytique. Cette dernière fait le plus souvent appel à des techniques séparatives généralement couplées à la spectrométrie de masse ou à des techniques spectrales. Le choix d'une technique par rapport à une autre sera orienté en fonction de la nature de l'information recherchée et de la nature de l'échantillon étudié. Lors de ce travail de thèse, nous sommes particulièrement intéressés à deux catégories de lipides : les glycérophospholipides et les sphingolipides ainsi qu'à leurs modifications dans différents types de macrophages exposés à différentes conditions de culture.

## **2 La préparation de l'échantillon**

La préparation de l'échantillon biologique est une étape nécessaire et déterminante à l'analyse des lipides<sup>3</sup>. Elle conditionne la qualité des observations effectuées et consiste à extraire les analytes d'une matrice. En effet, les lipides sont des molécules structurellement hétérogènes avec des propriétés

physico-chimiques très variables. La diversité des structures lipidiques peut complexifier leur extraction au sein des matrices biologiques. Les différents protocoles mis en jeu doivent être adaptés à la technique analytique choisie et à la nature de l'échantillon (tissus, organes, fluides biologiques...).

De plus, cette étape doit permettre l'extraction de lipides de polarité variable. La Figure 11 met en relation la polarité de quelques solvants utilisés en chromatographie liquide et la polarité de quelques classes lipidiques placées sur l'échelle d'Hildebrand. On observe effectivement que l'étendue des polarités observées est importante. En effet, les glycérolipides ou les esters de cholestérol ont une polarité proche des alcanes tandis que les PL ont une polarité proche de celle du méthanol.

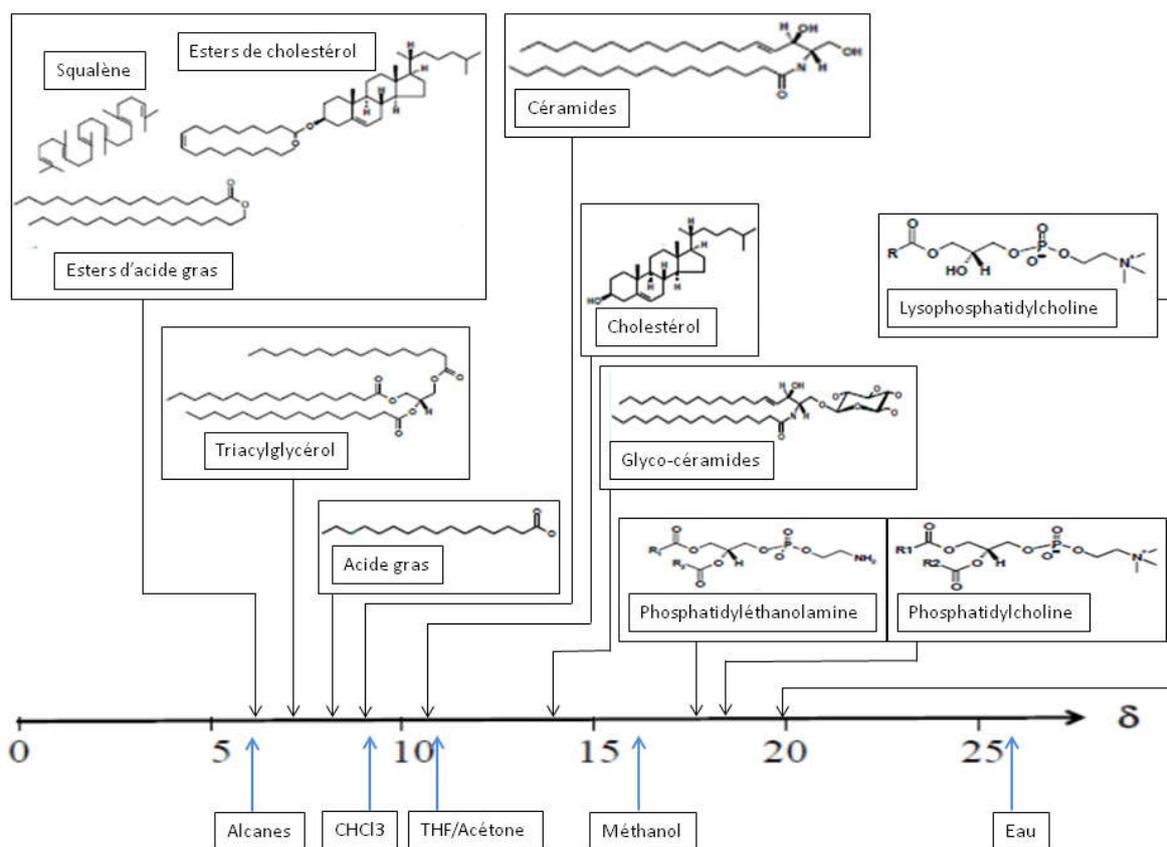


Figure 11 : Gamme de polarité des lipides et quelques solvants utilisés en chromatographie liquide placés sur l'échelle de polarité d'Hildebrand<sup>23</sup>

Plusieurs étapes de prétraitement de l'échantillon peuvent être nécessaires afin de réduire les interactions entre la matrice et les lipides avant leur extraction : broyage mécanique, déprotéinisation ou encore filtration. Les matrices biologiques sont souvent issues de biofluides (sang total, plasma, liquide céphalorachidien) ou encore de tissus ou de cellules en culture<sup>24-30</sup>.

L'objectif de cette étape est d'extraire sélectivement les lipides en quantité détectable par la technique analytique. La préparation de l'échantillon est souvent considérée comme une étape chronophage et difficilement automatisable. Elle doit de plus être reproductible pour éliminer une source de variabilité entre les différents échantillons. Une technique très souvent utilisée pour extraire les lipides d'un échantillon est l'extraction liquide-liquide<sup>31</sup>.

## **2.1 Extraction liquide-liquide**

### **2.1.1 Principe général**

L'extraction liquide-liquide est basée sur la répartition d'un composé organique entre une phase aqueuse et une phase organique non miscible. Cette partition repose sur le coefficient de partage de l'analyte entre la phase aqueuse et un solvant organique à une température donnée. Le coefficient de partage dépend de la solubilité de l'analyte dans chacune des deux phases. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour obtenir des rendements d'extraction importants : propriétés acido-basiques des molécules à extraire, nombre d'extractions successives et solubilité de l'analyte dans les différents solvants utilisés. Différentes étapes sont souvent nécessaires comme une agitation mécanique, une centrifugation pour améliorer la séparation de phases, une récupération de la phase organique et une évaporation de la phase organique permettant de préconcentrer les analytes avant la reprise des résidus secs, comme le montre la Figure 12. La préconcentration permet de solubiliser l'ensemble des analytes dans un faible volume de solvant, compatible avec le système analytique utilisé.

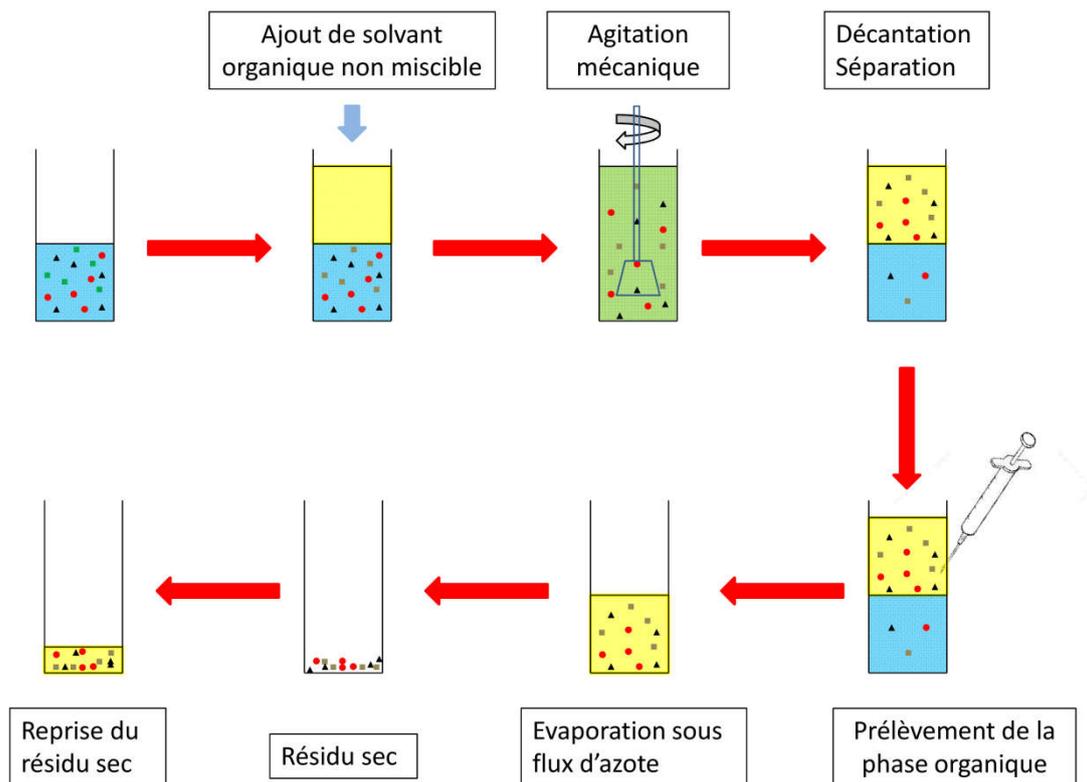


Figure 12 : Les étapes de l'extraction liquide-liquide

### 2.1.2 Extraction liquide-liquide appliquée aux lipides

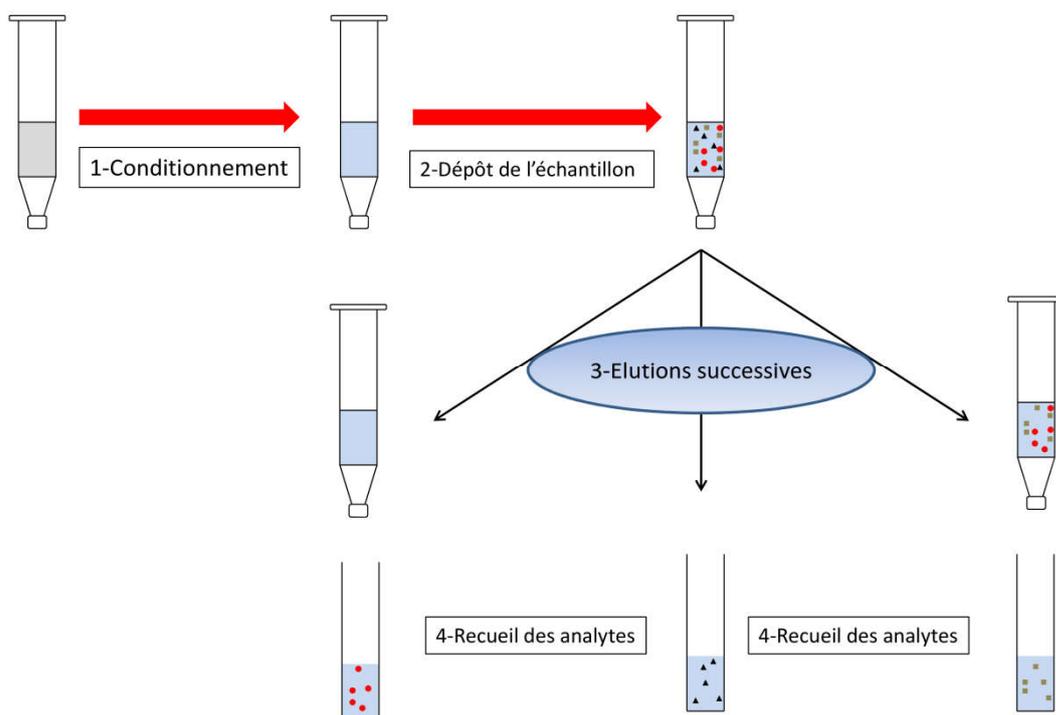
L'utilisation d'un seul solvant (méthanol, acétonitrile) a été décrite pour extraire des composés polaires, technique d'extraction relativement simple. Son utilisation est cependant assez récente pour l'extraction des glycérophospholipides du plasma humain en utilisant du méthanol en large excès<sup>32,33</sup>. En effet, couplée à une autre méthode d'extraction (Solide phase extraction : SPE), l'extraction de céramides a été décrite dans le plasma humain<sup>34</sup>. Néanmoins cette méthode reste limitée aux lipides les plus polaires (PL ou sphingolipides) et ne permet pas d'extraire les lipides neutres (triglycérides, ester de cholestérol).

Un compromis est donc indispensable pour solubiliser une grande partie des composés lipidiques dans la même phase organique : un mélange de solvants aux propriétés complémentaires est donc indispensable pour extraire une grande partie des composés lipidiques d'un échantillon biologique. Un nombre assez important de mélanges a été évalués<sup>35-39</sup> et les méthodes d'extraction les plus largement utilisées sont celles de Folch<sup>40</sup> et Bligh et Dyer<sup>41-43</sup> avec l'utilisation respective d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v) ou chloroforme/méthanol (1:2 ; v/v). La phase

méthanolique permet de solubiliser les lipides les plus polaires et le chloroforme favorise l'extraction des lipides neutres. La toxicité du chloroforme a poussé à développer des méthodes alternatives comme par exemple l'utilisation du tertbutylméthyléther comme solvant fort d'extraction qui présente des performances comparables au chloroforme à l'exception de l'extraction des PI<sup>44-46</sup>. L'acidification de la phase aqueuse ou l'ajout de solutions aqueuses salines peuvent augmenter les rendements d'extraction des composés lipidiques. En effet, seules les espèces non chargées sont extraites dans la phase organique et les lipides présentant des fonctions acides faibles seront non chargés en milieu acide. De plus, la solubilité des composés dans la phase aqueuse diminue lorsque la force ionique de la solution augmente<sup>47-49</sup>.

## **2.2 Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction : SPE)**

Les mécanismes de rétention impliqués lors de l'extraction en phase solide (SPE) s'apparentent à ceux de la chromatographie liquide. La SPE est basée sur la rétention des composés sur une phase stationnaire solide. La rétention des composés d'intérêt dépend de leur affinité avec le support de chromatographie. Une extraction en SPE se déroule en quatre étapes. La première est le conditionnement du support chromatographique permettant de préparer la phase solide au dépôt de l'échantillon. Si le conditionnement est mal réalisé, la rétention des analytes peut être altérée. La deuxième étape est le dépôt de l'échantillon ou percolation. Elle permet de créer des interactions entre les analytes et la phase stationnaire. A la suite du dépôt, un ou plusieurs lavages sont effectués pour éliminer les substances interférentes. Il s'agit donc d'une étape de purification de l'échantillon. Ces lavages doivent se faire avec des solvants ou un mélange de solvants permettant l'élution des molécules interférentes sans éluer les analytes d'intérêt. Enfin, l'élution des analytes d'intérêt est réalisée à l'aide d'un solvant ou d'un mélange de solvants afin de rompre les interactions qui existent entre la phase stationnaire et les analytes, Figure 13.



**Figure 13 : Principe général de la préparation de l'échantillon utilisant la technique d'extraction en phase solide**

La SPE est l'une des techniques les plus utilisées pour la préparation sélective des échantillons, en particulier à partir des matrices complexes. La diversité des propriétés physico-chimiques des supports commerciaux est l'une des raisons pour laquelle la SPE s'avère être une technique très intéressante pour la purification des extraits lipidiques. Les différentes phases stationnaires peuvent être composées de silice vierge dont le mode de rétention est comparable à la chromatographie à polarité de phase normale. Ce type de phase sera utilisé préférentiellement pour la rétention de composés polaires.

Les silices modifiées permettent de moduler les propriétés de rétention de la silice vierge en fonction des caractéristiques des composés d'intérêt. En effet, les supports commerciaux peuvent contenir des groupements aminopropyl ( $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ ), cyanopropyl ( $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$ ) ou phase diol (2,3 dihydroxypropoxypropyl). Ces phases possèdent des propriétés modérément polaires et sont utilisées comme une alternative à la silice vierge. D'autres supports de SPE peuvent contenir des groupements éthyl, octyl, octadecyl ou phényl. Ces phases présentent des caractéristiques de rétention apparentées aux mécanismes mis en jeu lors de la chromatographie à polarité de phases inversée. Enfin, des résines échangeuses d'ions peuvent être utilisées pour des analytes ionisés (amine

quaternaire, propylbenzènesulfonate, propylsulfonate<sup>50-54</sup>. Un arbre de décision est représenté Figure 14 en fonction des propriétés physico-chimiques des échantillons.

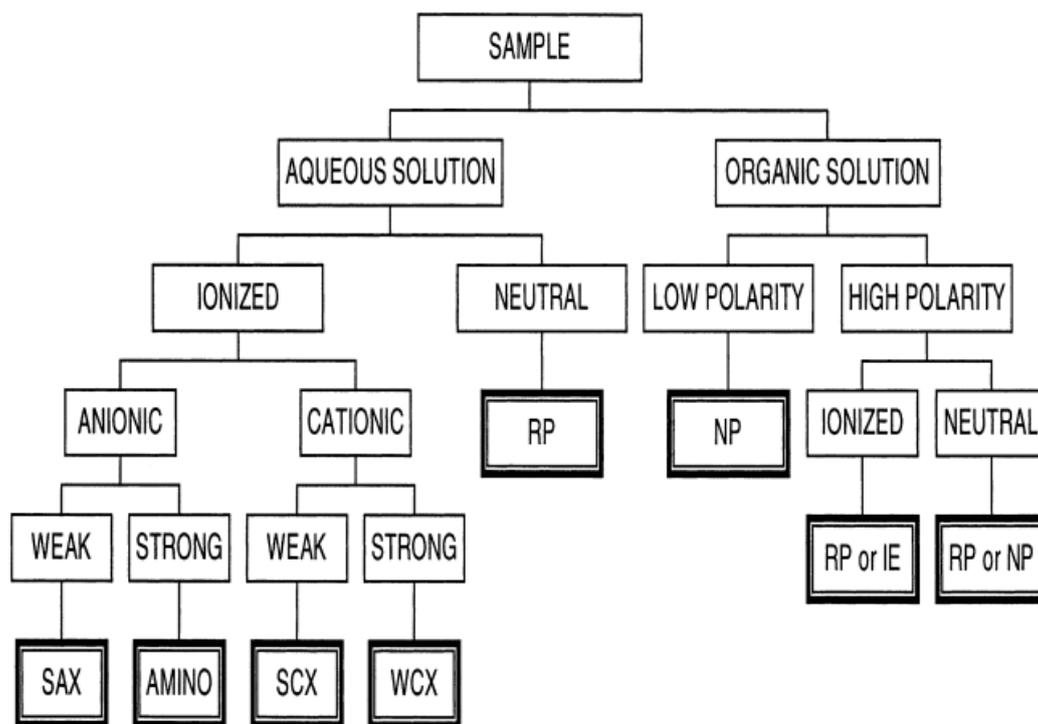
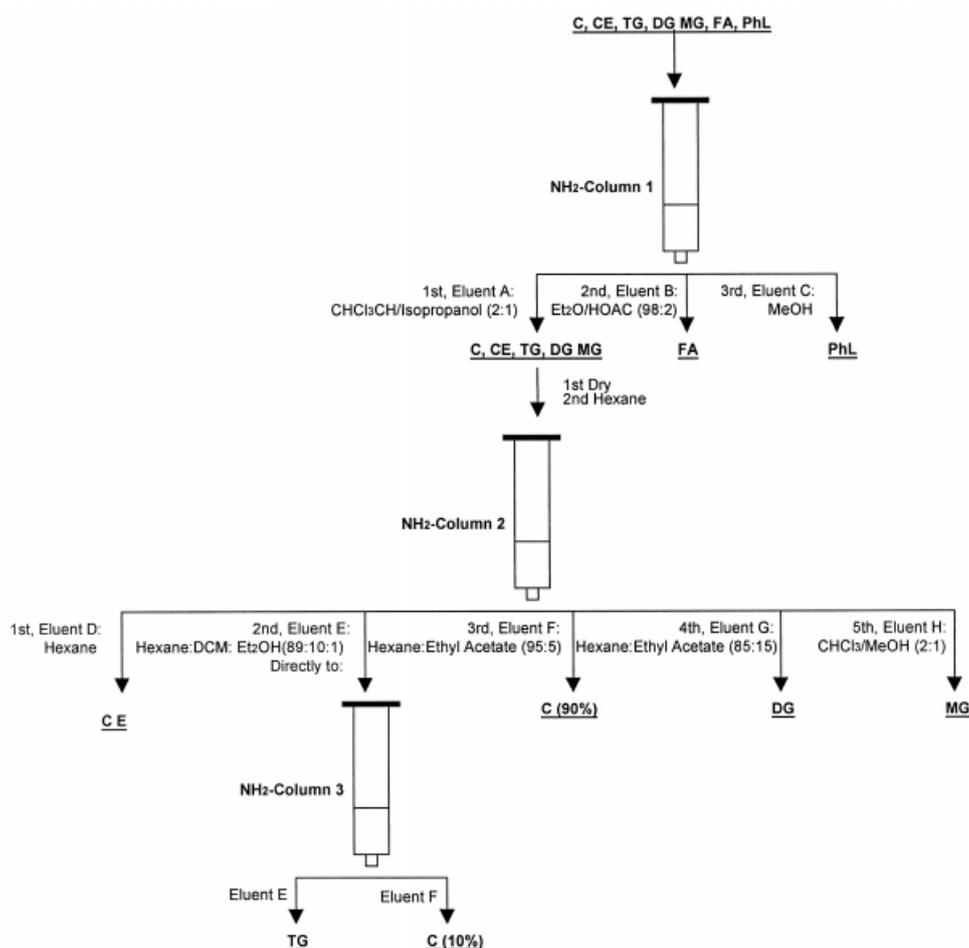


Figure 14 : Arbre de décision de l'utilisation de colonne SPE en fonction des propriétés physico-chimiques des échantillons<sup>51</sup>

La méthode de SPE a été largement utilisée pour l'extraction de lipides des fluides biologiques pour séparer certaines catégories de lipides. Juaneda et Rocquelin<sup>55</sup> ont publié en 1985 une méthode permettant de séparer les lipides neutres des lipides polaires dans un échantillon biologique. Ils ont utilisé un support présentant une phase stationnaire composée de silice vierge, les lipides neutres sont alors élués avec du chloroforme et les phospholipides sont élués avec du méthanol.

Les phases stationnaires greffées par des groupement aminopropyl ont été utilisées plus récemment par Bateman et Jenkins<sup>56</sup> pour isoler les lipides neutres des PL. La colonne est alors conditionnée avec de l'hexane, puis un mélange chloroforme/2-propanol ; les PL sont élués avec du méthanol. Dans cette méthode, une fraction d'éluion intermédiaire (diéthyléther/ acide acétique, 98 :2 ; v/v) est utilisée pour éluer les acide gras libres. Enfin en 1985, Kaluzny<sup>57</sup> publie une méthode pour séparer les différentes classes de lipides utilisant trois supports aminopropyl, Figure 15.



C : Cholestérol, CE : Esters de cholestérol, TG : Triglycérides, DG : Diglycérides, MG : Monoglycérides, FA : Acides gras, PhL : Phospholipides

Figure 15 : Fractionnement des classes lipidiques en utilisant des colonnes amino-propyle<sup>57</sup>

La SPE permet des extractions sélectives des classes de lipide et ainsi simplifie les échantillons biologiques avant analyse.

## 2.3 Extraction avec les fluides supercritiques et autres techniques en développement

Les fluides supercritiques possèdent certaines propriétés intéressantes pour l'extraction des composés lipidiques. En effet, l'augmentation de la pression et de la température vers les conditions supercritiques permettent *i)* une augmentation du pouvoir de solvation des différents composés, *ii)* une relativement faible viscosité et *iii)* une grande diffusibilité. Le fluide supercritique le plus utilisé est le CO<sub>2</sub> : il possède un couple pression et température supercritique (74 bars, 32 °C) relativement faible. Il est admis que la polarité du CO<sub>2</sub> supercritique est proche du pentane et il est donc adapté à

l'extraction de composés hydrophobes comme les lipides. L'ajout de modificateurs comme le méthanol, l'éthanol, le dichlorométhane ou l'eau permet de moduler les propriétés du fluide supercritique et peut permettre l'extraction des composés de polarité intermédiaire, comme les acides aminés ou les acides nucléiques. Le CO<sub>2</sub> supercritique est largement utilisé pour l'extraction des lipides contenus dans des matrices complexes comme des tissus animaux ou des plantes. Une comparaison de l'extraction des phospholipides par extraction liquide-liquide et extraction par un fluide supercritique a été menée. Elle montre que les rendements d'extraction par un fluide supercritique est meilleur par rapport à la méthode de Bligh et Dyer<sup>31</sup>. D'autres méthodes comme l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons peuvent également être utilisées<sup>58,59</sup>.

### **3 Analyses des lipides**

En raison de la complexité des mélanges lipidiques, l'analyse des lipides associe le plus souvent une technique séparative à une détection rendue difficile par des propriétés spectrales dans l'ultraviolet limité.

#### **3.1 Les méthodes de séparation**

##### **3.1.1 Chromatographie en phase gazeuse**

Les premières analyses des lipides furent réalisées en chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'utilisation des hautes températures pour vaporiser les analytes limite l'utilisation de cette technique. L'analyse directe des lipides par CPG est relativement peu décrite à l'exception des triglycérides<sup>60-62</sup>. En particulier, certains lipides comme les phospholipides sont thermosensibles et très peu volatils<sup>63</sup>. En effet, il est nécessaire que les analytes soient thermiquement stables et possèdent une pression de vapeur suffisante, ce qui n'est pas forcément le cas pour toutes les catégories de lipides. C'est pourquoi une étape de dérivatisation ou d'hydrolyse est souvent nécessaire. La principale application de la CPG couplée soit à un détecteur à ionisation de flamme (FID) ou de masse (impact électronique ou ionisation chimique) est l'analyse des AG méthylés<sup>64-67</sup>. Différentes méthodes existent pour réaliser l'étape de dérivatisation : la transestérification directe ou la saponification sont les techniques les plus largement utilisées pour des matrices végétales ou animales<sup>68-73</sup>. Ce sont des méthodes quantitatives mais qui entraînent une perte d'information structurale. La CPG permet donc l'analyse d'une catégorie restreinte de lipides. En chromatographie liquide haute performance, une gamme plus importante de lipides peut être analysée.

### 3.1.2 Chromatographie en phase liquide

Les techniques de chromatographie en phase liquide peuvent être classées en fonction de la polarité de la phase stationnaire. Généralement, on distingue les phases stationnaires polaires : chromatographie à polarité de phases normale (NP-LC) et les phases stationnaires apolaires : chromatographie à polarité de phases inversée (RP-LC). La chromatographie d'interaction hydrophile ou mode HILIC est un mode de chromatographie présentant des phases stationnaires proches de la NP-LC et une phase mobile hydro-organique proche de la RP-LC.

La diversité des propriétés physico-chimiques des structures lipidiques et en particulier de leur solubilité impose de travailler sur une gamme de polarité des supports chromatographiques et des phases mobiles très étendue (Figure 11). L'utilisation des différents modes de chromatographie permet de couvrir différentes zones de solubilité. Plusieurs paramètres de solubilité sont à considérer : les polarités de la phase stationnaire, de l'échantillon et des phases mobiles utilisées. En utilisant une représentation adaptée du travail de Schoenmakers<sup>74</sup> proposée par Tchaplá<sup>23</sup>, il est possible de définir les conditions chromatographiques permettant une bonne distribution des solutés comme le représente la Figure 16.

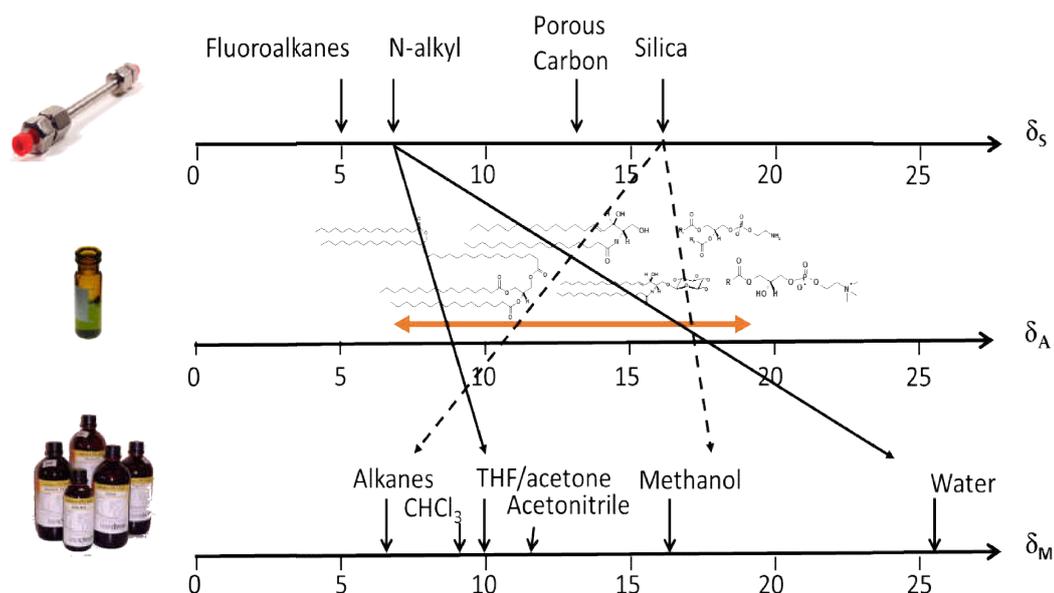


Figure 16 : Paramètres de solubilité ( $\delta$ ) des phases stationnaires ( $\delta_s$ ), des lipides ( $\delta_A$ ) et des phases mobiles ( $\delta_M$ )<sup>23</sup>

Chaque technique chromatographique permet de couvrir des gammes de polarité qui lui sont propres. Ainsi, les différents modes de chromatographie liquide ne couvrent pas l'intégralité du domaine de polarité des lipides. Une connaissance de l'ensemble des techniques est nécessaire pour adapter la technique de chromatographie à mettre en jeu en fonction de la polarité des lipides d'intérêt.

### 3.1.2.1 Chromatographie à polarité de phases normale

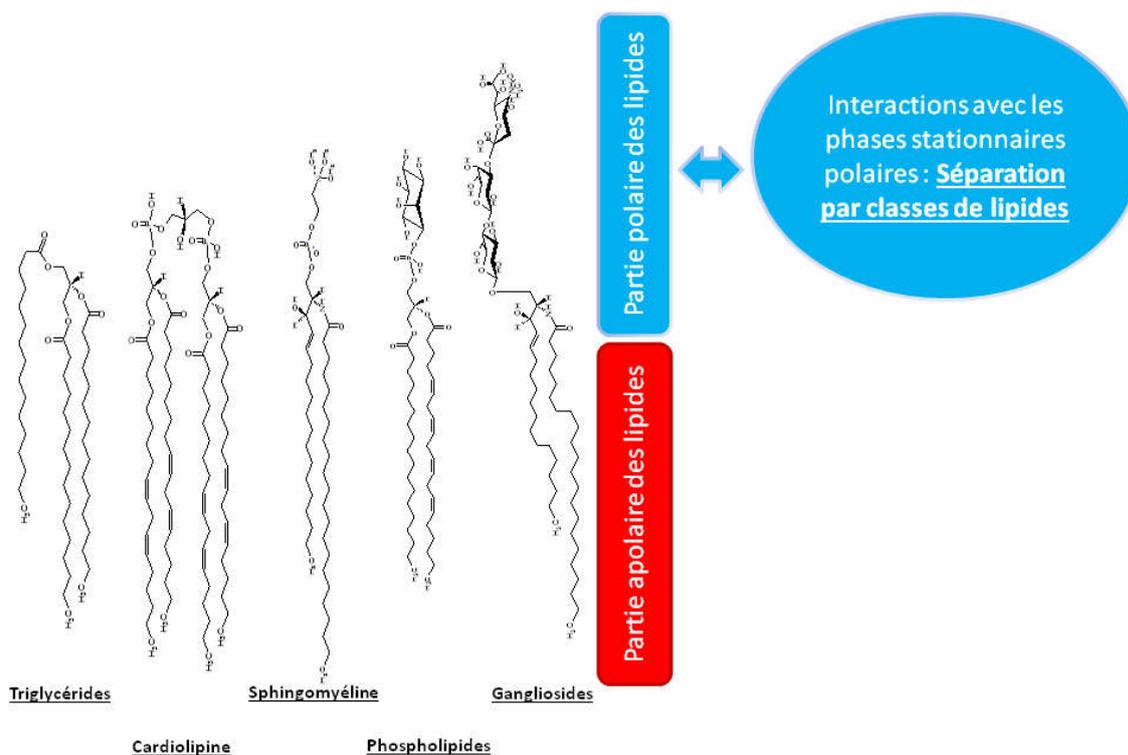
En NP-LC, la phase stationnaire est polaire tandis que la phase mobile est apolaire et le plus souvent organique. On distingue les phases stationnaires constituées de gel de silice vierge. Ce support est considéré comme un solide hétérogène. En effet, on distingue principalement trois sites participant à la rétention : les groupements silanols libres, les groupements silanols liés entre eux par liaison hydrogène et les silanols libres liés à une molécule d'eau. Le principal mécanisme impliqué dans ce mode de rétention est basé sur le déplacement des molécules de solvants adsorbés à la surface de la phase stationnaire par les molécules de solutés. La teneur en eau de la phase mobile est une donnée fondamentale étant donné qu'elle s'adsorbe préférentiellement aux silanols libres et modifie la constante de distribution des solutés. Si cette teneur en eau est maintenue constante, il est possible de modéliser les phénomènes de rétention selon la théorie de Snyder et Soczewinski<sup>75</sup>. Ce modèle prend en compte les caractéristiques du soluté, de la phase éluante et de la géométrie de la colonne chromatographique. La formule du facteur de rétention est présentée ci-dessous (Équation 1).

$$\log k' = \log V_a + \beta (E_0 + A_s \varepsilon_0) + \log \frac{W_a}{W_m}$$

**$k'$  : facteur de rétention,  $E_0$  : énergie libre d'adsorption des molécules de solutés,  $A_s$  : surface occupée par le soluté sur l'adsorbant,  $\beta$  : mesure de l'activité de l'adsorbant prenant en compte le nombre de groupements silanols libres,  $\varepsilon_0$  : énergie libre réduite d'adsorption des molécules de phase mobile par unité de surface de solvant adsorbé,  $V_a$  : volume de phase mobile adsorbé par unité de masse,  $W_a$  : masse de silice contenue dans la colonne,  $V_m$  : volume total de phase mobile contenu dans la colonne**

**Équation 1 : Formule du facteur de capacité en chromatographie d'adsorption proposé par Snyder et Soczewinski**

La silice vierge constitue un support pour greffer des constituants organiques polaires. Les phases stationnaires à base de silice greffée sont notamment les groupements aminopropyle<sup>76,77</sup>, cyano<sup>78</sup>, diol<sup>79-81</sup> ou le groupement polyvinyl alcool polymérisé lié à des particules de silice<sup>82,83</sup>. Les parties polaires de la phase stationnaire sont solvatées par les molécules les plus polaires de la phase mobile. Les solutés interagissent soit avec la phase liquide polaire ou déplacent l'équilibre entre la phase stationnaire et la phase mobile polaire. Appliqué aux lipides, les interactions entre la phase stationnaire et les analytes font intervenir la partie polaire des lipides comme le montre la Figure 17.



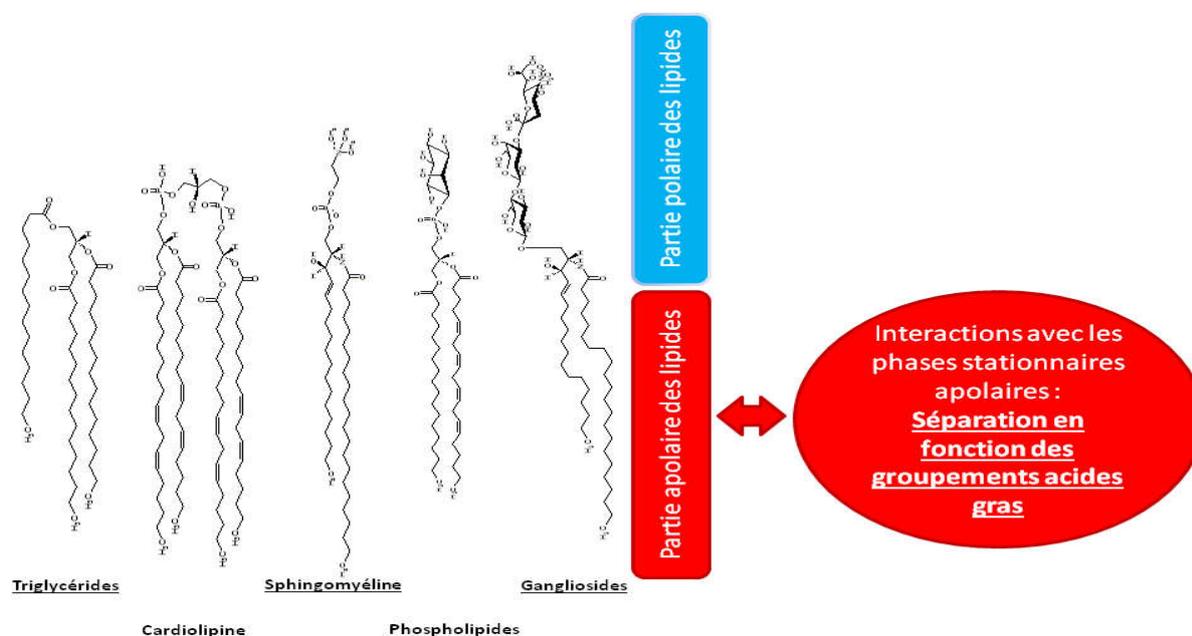
**Figure 17 : Schématisation des interactions entre différentes classes de lipides et les phases stationnaires polaires utilisées en chromatographie en phase normale**

Ce mode de chromatographie permet l'élution de lipides peu polaires comme les esters de cholestérol jusqu'aux glycérolipides<sup>84,85</sup>. L'ajout d'une faible proportion d'eau permet l'élution de composés plus polaires comme les phospholipides et ainsi de couvrir une large gamme de polarité qui correspond au domaine de polarité des différentes catégories de lipides<sup>86-96</sup>. La NP-LC permet une séparation des lipides par classe ordonnée en fonction de la polarité de leur tête polaire, en revanche elle ne permet pas de séparer les différentes espèces moléculaires d'une même classe de lipides<sup>97,98</sup>. Chaque classe de lipides est présentée sous forme d'un seul pic chromatographique plus ou moins large regroupant la majorité des espèces moléculaires de cette classe.

### 3.1.2.2 Chromatographie à polarité de phases inversée

En RP-LC, la phase stationnaire est composée d'une phase stationnaire apolaire et d'une phase mobile polaire. Ici, les mécanismes de rétention sont fondés sur deux théories : le partage<sup>99-103</sup> et la théorie solvophobique qui considère que la rétention des solutés est gouvernée par l'importance du contact entre le soluté et les chaînes de la phase stationnaire solvatées<sup>104,105</sup>. La silice est greffée par

des groupements de nature apolaire comme des groupements alkyles (de C2 à C18), cyano ou phényle. La phase mobile est composée d'un mélange hydro-organique dans lequel le solvant organique constitue le solvant fort et favorise l'élution des composés. Ce mode de chromatographie permet de séparer les lipides en fonction de la partie la plus apolaire de leur structure constituée le plus souvent par les chaînes hydrocarbonées des acides gras, comme le montre la Figure 18.



**Figure 18 : Schématisation des interactions entre différentes classes de lipides et les phases stationnaires apolaires utilisées en chromatographie à polarité de phases inversée**

La rétention des composés dépend notamment du nombre d'insaturations et de la longueur des chaînes hydrocarbonées<sup>23,106</sup>. Ces interactions sont principalement présentes au niveau des chaînes d'acide gras. Il est possible de prévoir la rétention des lipides en RP-LC en calculant le nombre d'équivalent carbone (ECN) ;  $ECN = CN - 2n$ . CN est le nombre de carbone des chaînes, n est le nombre d'insaturations. L'ECN permet de prévoir les éventuelles co-élutions des différentes espèces moléculaires de lipides en RP-LC. Il existe principalement deux modes de chromatographie en phase inverse : la chromatographie liquide en phase inverse non aqueuse (NARP : Non Aqueous Reversed Phase) particulièrement adaptée aux classes de lipides les plus apolaires<sup>107-110</sup> et la RP-LC partiellement aqueuse (Partial Aqueous Reversed Phase ou PARP) pour les classes plus polaires comme les phospholipides<sup>111,112</sup>.

### 3.1.2.3 Chromatographie d'interaction hydrophile

Le mode de séparation chromatographie d'interaction hydrophile ou HILIC présente une grande diversité de phases stationnaires polaires pouvant se rapprocher des phases utilisées en NP-LC normale (Silice vierge ou greffée par des groupements polaires tels que les groupements diol, amide ou amine). La phase mobile est constituée d'un mélange hydro-organique proche des mélanges utilisés en RP-LC<sup>113,114</sup>. Ce mode de chromatographie permet la séparation des lipides de polarité intermédiaire. Il présente de nombreuses applications pour la séparation des lipides par classes notamment concernant les glycérophospholipides et les sphingolipides<sup>115-118</sup>. En revanche, concernant les classes les plus apolaires, ce mode de séparation présente des limites au niveau de l'efficacité ou des propriétés de rétention<sup>119</sup>.

#### **3.1.2.4 Chromatographie en fluide supercritique**

Le CO<sub>2</sub> supercritique est un fluide qui possède des propriétés de polarité proches de celles de l'hexane et permet donc la séparation des lipides les plus apolaires. Les lipides les plus polaires ne sont donc théoriquement pas concernés par ce mode de séparation mais l'ajout de modificateur tel que le méthanol permet de pouvoir séparer des lipides de polarité intermédiaire tels que les phospholipides<sup>120,121</sup>. L'application de la chromatographie en fluide supercritique concerne les cires, les céramides et les triglycérides<sup>122,123</sup>.

#### **3.1.2.5 La chromatographie bidimensionnelle**

L'utilisation de deux modes de séparation complémentaires ou orthogonaux présente l'avantage de coupler plusieurs mécanismes de rétention pouvant améliorer la capacité de séparation des mélanges lipidiques complexes. Le principal intérêt de l'analyse bidimensionnelle est de permettre d'effectuer des séparations dans un premier temps par classes lipidiques puis par espèces moléculaires de même classe. Ce mode de séparation peut être en ligne si les différents solvants sont compatibles entre eux (HILIC/RP) ou hors ligne si les différents solvants ne sont pas miscibles comme par exemple NP-LC et RP-LC. Le mode hors ligne présente l'inconvénient d'avoir un temps d'analyse important et un problème de répétabilité alors que le mode en ligne peut être automatisé et présente une meilleure répétabilité. Il est aussi possible de coupler un seul mode de séparation pour caractériser une classe lipidique<sup>124-130</sup>, comme par exemple l'utilisation en 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> dimension d'une séparation en RP-LC.

#### **3.1.2.6 Les dernières innovations en chromatographie liquide**

La chromatographie en phase liquide est une technique majeure permettant l'analyse d'un grand nombre d'analytes. De nouvelles innovations technologiques ont permis d'augmenter la résolution des pics chromatographiques et de diminuer le temps d'analyse. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour atteindre ces objectifs.

La première stratégie en RP-LC consiste à augmenter la température lors de la séparation. En effet, l'augmentation de la température diminue la polarité de la phase mobile. Ainsi, il est possible de remplacer une part de phase mobile organique par de l'eau et d'obtenir des séparations proches de celles obtenues à température ambiante. De plus, l'augmentation de la température diminue la viscosité de la phase mobile. Conformément à la loi de Darcy, la diminution de la viscosité permet ainsi de diminuer la pression générée dans la colonne chromatographique (Équation 2)

$$\Delta P = \frac{\eta Lu}{dp^2}$$

**Équation 2 : Loi de Darcy (L : longueur de la colonne, u : vitesse linéaire de la phase mobile, dp : diamètre des particules,  $\eta$  : viscosité de la phase mobile)**

L'augmentation de la température peut engendrer des gains de performance importants surtout lorsque l'on travaille à des températures supérieures à 100 °C. En effet, la diminution de la viscosité de la phase mobile permet l'utilisation de colonnes plus longues ou de plus faible granulométrie pour un gain résolutif ou permet d'augmenter la vitesse linéaire de la phase mobile. Cependant, cette approche est limitée par la stabilité de la phase stationnaire à haute température<sup>131-133</sup>. Certains matériaux ont été développés en ce sens comme le dioxyde de zirconium ou le titane mais ils ne présentent pas les mêmes efficacités que les colonnes remplies de silice<sup>134</sup>. Il est alors nécessaire d'effectuer un préchauffage de la phase mobile. De manière générale, une séparation à de très hautes températures reste délicate à maîtriser et peut présenter certains inconvénients. Cette méthodologie a été utilisée pour la séparation de classes lipidiques comme le squalène, le cholestérol et des céramides. Cette méthode utilise un support chromatographique Hypercarb<sup>®</sup> permettant de travailler à des températures supérieures à 100 °C. L'utilisation d'un système miniaturisé nécessite moins de solvants organiques et facilite le maintien d'une haute température dans tout le système. Cette méthode utilisée en mode gradient fait appel à un mélange de solvant éthanol/butanol<sup>135</sup> à des température de travail de 150 °C. Il est généralement admis qu'à l'heure actuelle les températures de travail se situent autour de 60 à 90 °C<sup>136,137</sup>.

Une deuxième approche pour augmenter l'efficacité et diminuer le temps d'analyse peut consister à utiliser des colonnes remplies de particules de silice poreuse de diamètre inférieur à 2  $\mu\text{m}$ .

Cette technologie est connue sous le nom de chromatographie liquide à ultra-haute pression ou UHPLC. Le gain d'efficacité qui en résulte peut être modélisé par l'Équation 3 suivante :

$$N = \frac{L}{h dp}$$

**Équation 3 : Relation entre l'efficacité (N), la longueur de la colonne (L) et le diamètre des particules (dp) contenues dans la colonne chromatographique**

L'utilisation de particules de silice de diamètre inférieur à 2 µm a pour conséquence d'augmenter la pression au sein du système chromatographique conformément à la loi de Darcy (Équation 2). En effet, la perte de charge est inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules. Les innovations technologiques en chromatographie permettent de disposer de systèmes pouvant résister à des pressions supérieures à 1000 bars. De plus, un certain nombre de caractéristiques instrumentales ont dû être optimisées. En effet, les systèmes chromatographiques UHPLC doivent pouvoir minimiser les dispersions extra-colonne. L'utilisation de tubulures de diamètre de 10 µm ainsi que le développement d'injecteurs permettant de réaliser des injections répétables de 0,1 à 2 µL ont permis de minimiser ce phénomène<sup>138-140</sup>. Par ailleurs, le volume de délai existant en mode gradient peut soumettre les échantillons à une migration isocratique indésirable en début de gradient. Pour limiter ce phénomène, le volume de la chambre de mélange peut être réduit et un système de mélange haute pression des phases mobiles a été développé. Certains fournisseurs ont développé des mélangeurs basse pression permettant plus de flexibilité mais cette technologie augmente le volume de délai<sup>141</sup>.

Depuis 2007, de nouveaux supports chromatographiques ont été commercialisés utilisant des particules de silice superficiellement poreuse. Ces supports ont été développés par Horváth puis par Kirkland. Ces supports sont constitués d'un cœur (core) non poreux sur lequel vient se fixer une enveloppe (shell) de silice poreuse. La taille des particules commercialisées peut aller de 5 µm à moins de 3 µm. Ces colonnes ont une efficacité proche des colonnes sub 2 µm avec une perte de charge beaucoup plus faible. Ces colonnes peuvent éventuellement être utilisées sur des systèmes chromatographiques conventionnels. Les améliorations obtenues grâce à ce type de support peuvent être décrites grâce à l'équation de Van Deemter (Équation 4).

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + Cu$$

**Équation 4 : Equation de van Deemter (HEPT : hauteur équivalente des plateaux théorique ; A : diffusion turbulente ; B : dispersion moléculaire longitudinale ; C : résistance au transfert de masse et u : vitesse linéaire de la phase mobile)**

L'avantage d'utiliser des colonnes core-shell réside dans le fait qu'il existe une réduction significative des phénomènes de dispersion longitudinale (B) et des phénomènes de diffusion turbulente (A). La diminution du terme (B) réside dans le fait que les colonnes core-shell sont mieux remplies par comparaison aux colonnes ayant des particules totalement poreuses. La fraction de volume supplémentaire est ici occupée par de la silice poreuse qui limite la diffusion coaxiale des analytes. La diminution de la diffusion turbulente est quant à elle, due à une distribution plus serrée des particules<sup>142-144</sup>. Dans le cas de l'UHPLC, c'est principalement la diminution du terme C (résistance au transfert de masse) qui permet d'obtenir des séparations rapides et efficaces. Enfin, l'influence de la température sur les paramètres de l'équation de Van Deemter est plus délicate d'interprétation. En effet, l'impact de l'augmentation de la température est relativement controversé concernant le terme A. Mais il semble établi que le terme C diminue avec l'augmentation de la température tandis que le terme B augmente<sup>134,145,146</sup>.

Le gain en résolution lors des séparations a conduit à obtenir des pics chromatographiques particulièrement fins. De ce fait, la fréquence d'acquisition des détecteurs a dû être augmentée pour atteindre 80 à 200 Hz afin de conserver des performances acceptables en termes de quantification. Cette fréquence d'acquisition est atteinte pour les détecteurs UV-visible ou DEDL (détecteur évaporatif à diffusion de la lumière) mais pose certains problèmes pour le couplage à la spectrométrie de masse ultra-haute résolution notamment<sup>147-149</sup>. Enfin, l'augmentation importante de la pression autour de 1 400 bars provoque un échauffement résultant de la friction entre la phase mobile et la phase stationnaire. Cela provoque un gradient de température longitudinal et radial au sein de la colonne chromatographique et entraîne une difficulté à maintenir la température constante au sein du système. Ce phénomène peut provoquer une perte d'efficacité et pose des problèmes de répétabilité. La diminution du diamètre des colonnes ou le développement de four à colonne adapté à cette problématique peuvent être des solutions<sup>150</sup>.

L'utilisation de ces nouvelles phases engendre de nouvelles possibilités dans la mise en œuvre d'une méthode chromatographique. La chromatographie haute résolution présente un grand intérêt pour diminuer le temps d'analyse et aussi pour l'analyse de mélanges complexes tels que les échantillons biologiques, en particulier dans le domaine de l'analyse des lipides<sup>151-154</sup>. La diversité de mise en œuvre de la chromatographie liquide permet de répondre de façon pertinente au défi présenté par l'analyse de l'ensemble des composés lipidiques. Une technique de séparation performante est particulièrement utile pour simplifier les échantillons complexes notamment lors du couplage au système de détection.

## 3.2 La détection des lipides

La détection des lipides est rendue très difficile par spectroscopie ultra-violet/visible car il s'agit de molécules dépourvues de groupement chromophore exploitable. La mise au point du détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) à la fin des années 1970 puis du détecteur à aérosol chargé (CAD) en 2004 a représenté une avancée majeure pour l'analyse des lipides.

### 3.2.1 Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et le détecteur à aérosol chargé

Ces deux détecteurs présentent un fonctionnement similaire concernant les deux premières étapes. En effet, la phase mobile et les analytes sont nébulisés grâce à un gaz inerte et un nébuliseur en sortie de colonne chromatographique. Un fin nébulisat est alors formé. Puis le nébulisat est entraîné par le flux du gaz vecteur vers un tube de chauffage pour évaporer la phase mobile. Enfin, dans le cas du DEDL, la détection du brouillard de soluté est réalisée par diffusion de la lumière. L'intensité de la lumière diffusée dépend de la densité et de la taille des gouttelettes ou des particules composant le brouillard. Dans le cas du CAD, les particules d'analytes sont chargées par le transfert de charge des molécules de diazote elles-mêmes chargées par une décharge Corona. Le signal résultant dépend du nombre de particules ou gouttelettes et de leur charge<sup>155,156</sup>.

Ces détecteurs quasi-universels ont été utilisés lors de nombreux travaux pour l'analyse des lipides et des glucides en raison des faibles propriétés spectrales de ces molécules<sup>157-161</sup>. Ils sont compatibles avec une large gamme de solvants et de modificateurs. La réponse dépend de la volatilité des solvants de la phase mobile, elle est plus importante lorsque la phase mobile est riche en solvant organique. La réponse obtenue varie en mode gradient d'éluion. Il est préférable d'utiliser le CAD par rapport au DEDL, lorsque le domaine de travail fait appel à des concentrations d'analytes faibles. Il est en effet plus sensible aux faibles concentrations. Avec ce type de détecteurs, l'identification des structures lipidiques repose sur la comparaison des temps de rétention entre un standard et les analytes sur les profils chromatographiques obtenus. Pour réaliser une identification structurale, la spectrométrie de masse est une technique de référence, Figure 19.

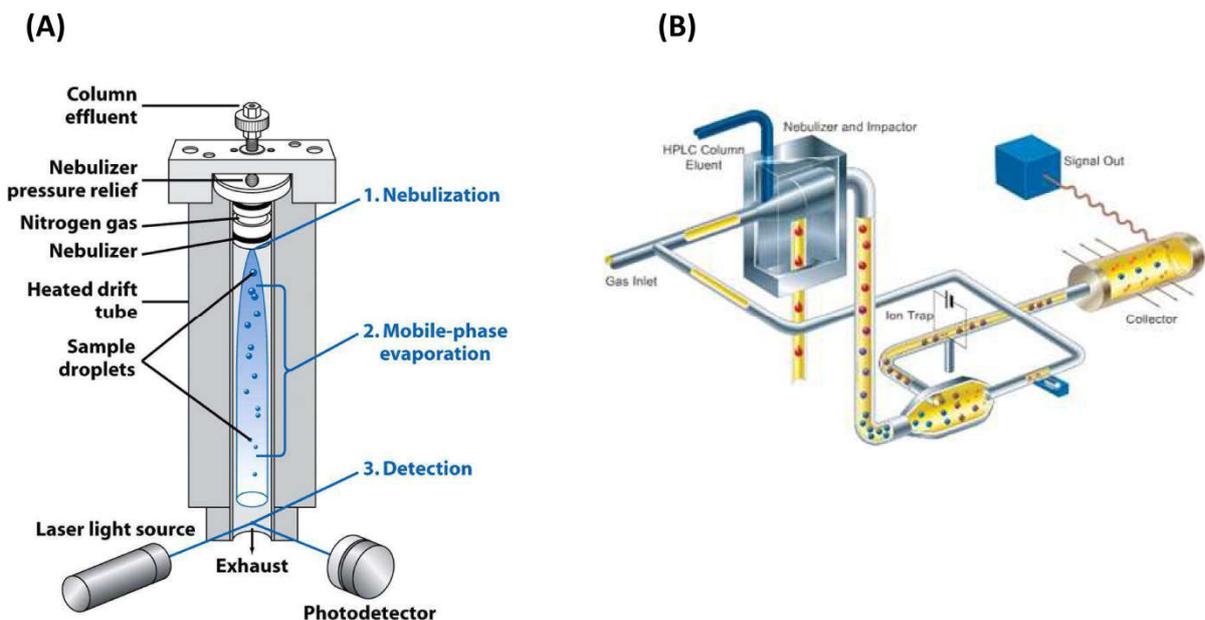


Figure 19 : Schéma et principe de fonctionnement des détecteurs (A) évaporatifs à diffusion de la lumière et (B) à aérosol chargé

### 3.2.2 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique de choix pour l'analyse des lipides. Les appareils sont composés : i) d'un système d'introduction directe de l'échantillon, soit après séparation chromatographique, ii) d'une source d'ionisation conduisant à l'ionisation des analytes (ions quasi-moléculaires), iii) d'un analyseur conduisant à la séparation des ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ), iv) d'un détecteur et d'un système de traitement des données. La Figure 20 représente schématiquement les différentes parties d'un spectromètre de masse. Les ions moléculaires peuvent être fragmentés dans la source, dans une trappe ou dans une chambre d'ionisation.

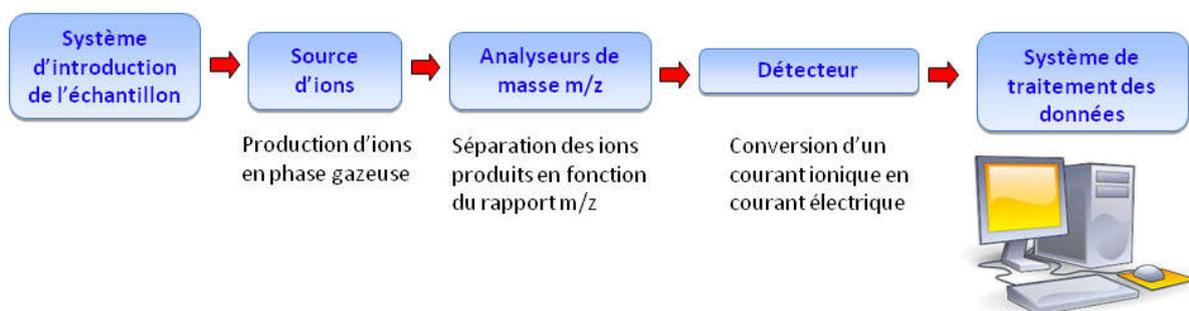


Figure 20 : Schéma d'un spectromètre de masse

### 3.2.2.1 Les sources d'ionisation

Les sources utilisées en spectrométrie de masse sont basées soit sur l'ionisation en phase gazeuse soit sur la désorption-ionisation des analytes ou encore par un processus de désolvatation-ionisation. Cette étape d'ionisation peut se dérouler sous vide ou à pression atmosphérique.

#### A) Ionisation sous vide

##### 1 / Impact électronique

L'impact électronique est la source d'ionisation la plus ancienne. Elle a été inventée par Dempster en 1918 puis a été perfectionnée<sup>162,163</sup>. C'est une source d'ionisation largement utilisée en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse permettant l'analyse de composés volatils qui sont ionisés directement en phase gazeuse. Les composés doivent être thermiquement stables car la source fonctionne à haute température pour éviter la condensation des analytes et ainsi les maintenir à l'état gazeux, Figure 21.

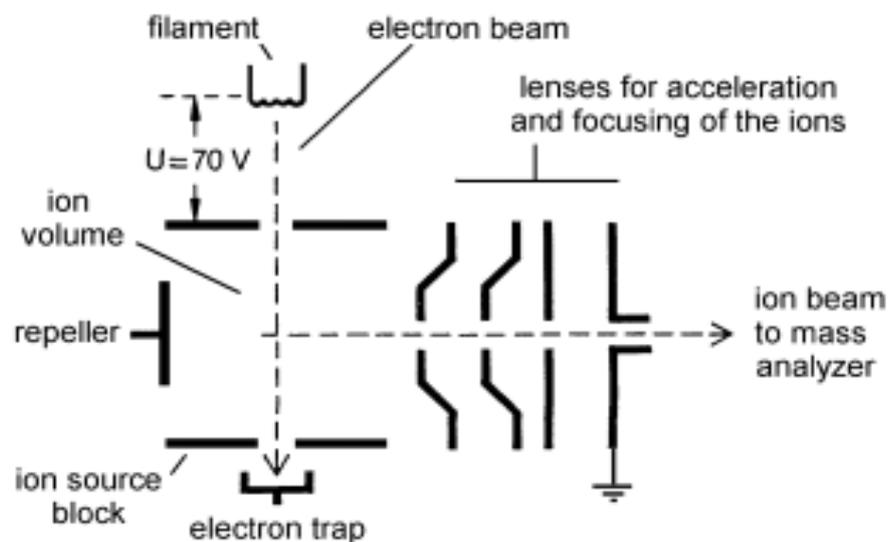
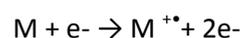


Figure 21 : Schéma d'une source d'ionisation à impact électronique<sup>164</sup>

La source est constituée d'un filament chauffé producteur d'électrons. Les électrons produits sont accélérés vers l'anode et entrent en collision avec les molécules en phase gazeuse. L'énergie cinétique atteinte par les électrons est de 70 eV.



Le cation radical ainsi formé est appelé ion moléculaire. L'énergie d'ionisation d'une molécule est généralement de l'ordre d'une dizaine d'eV. Lors de l'ionisation, entre 10 et 20 eV sont transférés aux molécules. L'excédent d'énergie peut provoquer la dissociation des ions moléculaires. Ainsi, les ions moléculaires peuvent se fragmenter et produire des cations de masse inférieure. Cette source induit une fragmentation importante de sorte que l'ion moléculaire est inconstamment observé.

## 2 / L'ionisation chimique

L'ionisation chimique présente un fonctionnement similaire par rapport à l'impact électronique. Le principe est l'ionisation des molécules de gaz réactant (méthane, butane, ammoniac) par impact électronique. Les molécules de gaz réactant ionisées échangent avec les analytes des charges et peuvent ainsi produire des ions pseudo-moléculaires ou des adduits, Figure 22.

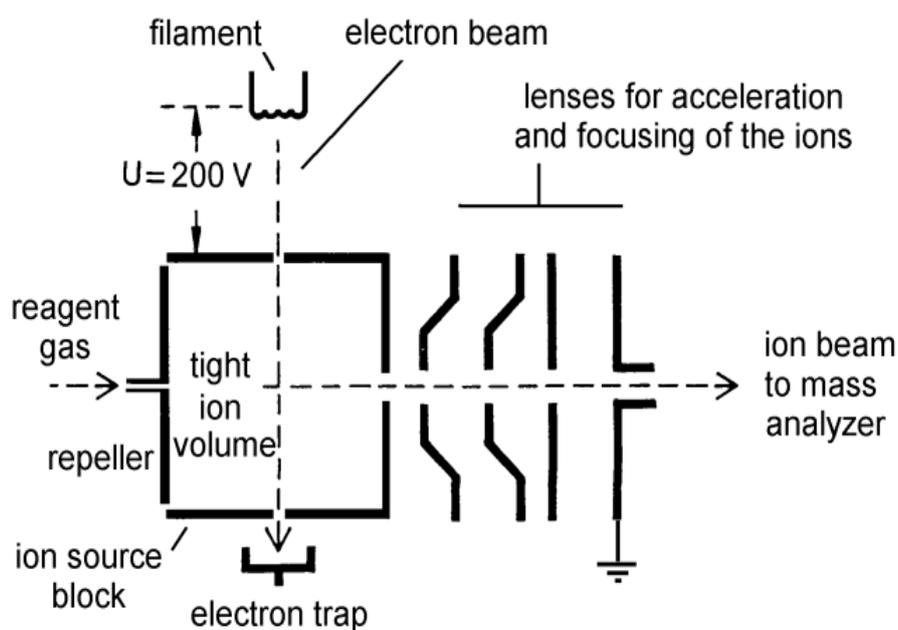


Figure 22 : Schéma d'une source d'ionisation à impact électronique<sup>164</sup>

L'ionisation chimique représente une méthode d'ionisation plus douce que l'impact électronique. Actuellement, la majorité des instruments commercialisés disposent de la possibilité de changer rapidement la source d'ionisation : de l'impact électronique à l'ionisation chimique<sup>165,166</sup>. Les sources d'ionisation douce les plus couramment utilisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) sont les sources à pression atmosphérique.

## B) Ionisation à pression atmosphérique

**1 / L'électrospray (ESI)** est caractérisé par une ionisation douce produisant peu d'ions fragments. Il est particulièrement adapté à l'analyse de composés de polarité moyenne avec un poids moléculaire important. En sortie de colonne chromatographique, la phase mobile contenant les analytes chemine par l'intermédiaire d'un capillaire vers la source. La formation des ions s'effectue par un processus de désolvatation-ionisation sous l'action d'un champ électrique intense de plusieurs kV. A l'extrémité du champ électrique, l'accumulation de charges forme un « cône de Taylor ». Par répulsion coulombienne, de fines gouttelettes se détachent du cône de Taylor pour former un nébulisat constitué de molécules de solvant et d'analytes chargés. Les molécules de solvant sont évaporées par un flux d'azote chauffé, la taille des gouttelettes diminue. Alors, une explosion coulombienne se produit lorsque la répulsion des charges des analytes devient supérieure à la tension de surface des gouttelettes : il en résulte la production d'analytes ionisés en phase gazeuse<sup>167-169</sup>, Figure 23.

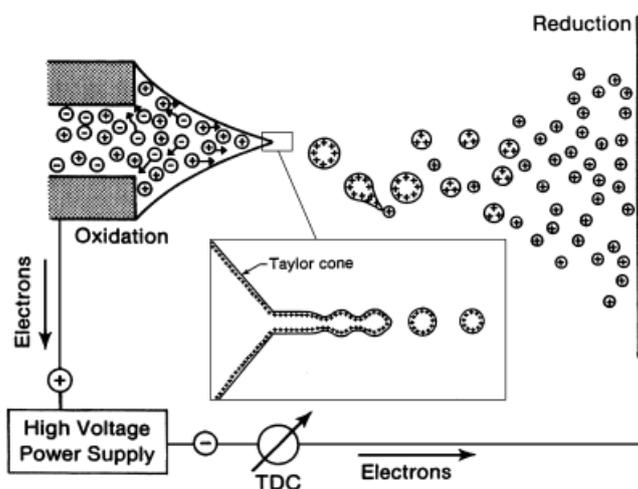


Figure 23 : Principe de l'électronebulisation<sup>164</sup>

L'ESI présente l'avantage d'introduire des analytes en solution permettant le couplage à la chromatographie en phase liquide. L'ionisation est relativement douce et produit peu d'ions fragments. En revanche, le principal inconvénient de la source ESI est une baisse de sensibilité avec la présence de sels dans la phase mobile. Elle présente également des difficultés à ioniser des molécules peu polaires tels les lipides non polaires, les molécules solubles dans des solvants tel l'heptane ayant une faible affinité protonique<sup>170</sup>. La source ESI est particulièrement adaptée à l'analyse des phospholipides, constituants majeurs des membranes cellulaires<sup>171-173</sup>.

**2 / L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)** s'effectue aussi en phase gazeuse. En revanche, les solutés présents dans la phase mobile sont nébulisés par du diazote chauffé (300-600 °C). Ces solutés sont amenés vers une aiguille à décharge Corona et le gaz s'ionise.  $N_2^+$  réagit avec les molécules d'eau présentes dans l'environnement et conduit à la formation d'analytes ionisés positivement ou négativement (réactions analytes  $H_3O^+$  ou radical  $HO^\bullet$ ). Cette source permet une meilleure ionisation des lipides peu polaires. Cependant, l'énergie apportée par l'aiguille Corona conduit à de nombreuses fragmentations dans la source<sup>174-177</sup>.

**3 / La photoionisation à pression atmosphérique (APPI)** dont le principe d'ionisation est comparable à celui de l'APCI. La principale différence est que l'ionisation s'effectue non plus par une décharge Corona mais par des photons obtenus à partir d'une lampe à krypton qui produit une énergie comprise entre 9 et 11 eV. La photoionisation directe des analytes possède un faible rendement, notamment à cause de la présence du solvant dans lequel les analytes sont solubilisés. Un dopant est nécessaire pour augmenter le rendement d'ionisation (toluène et/ou acétone)<sup>178</sup>. Il peut entrer dans la composition de la phase mobile ou être ajouté en post-colonne.

L'ensemble des sources à pression atmosphérique permet d'explorer toute la gamme de polarités des lipides biologiques. Le rendement d'ionisation dépend notamment des différentes classes lipidiques, du mode d'ionisation (positif ou négatif), de la nature des solvants dans lesquels les lipides sont solubilisés mais aussi de la nature de la source utilisée. Même si chaque classe lipidique a des propriétés différentes vis-à-vis des différentes sources à pression atmosphérique, on peut généraliser en disant que l'APPI est la source la plus adaptée pour l'analyse des lipides non polaires tandis que l'ESI et APCI conviennent mieux pour l'analyse des lipides polaires<sup>149,179,180</sup>, Figure 24.

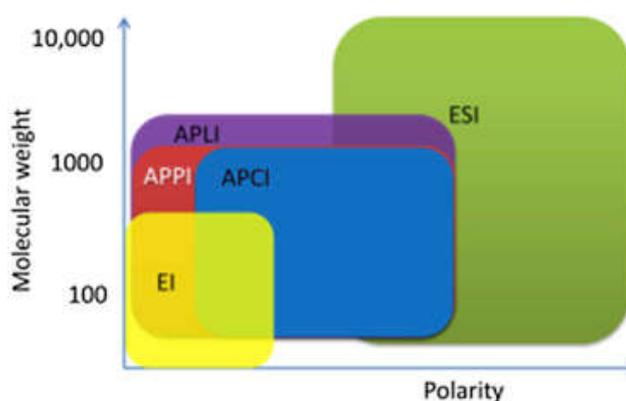


Figure 24 : Domaine d'utilisation des principales sources d'ionisation utilisées en couplage GC-MS et LC-MS<sup>181,182</sup>

L'ionisation au laser à pression atmosphérique (Atmospheric pressure laser ionization ou APLI) est aussi une méthode d'ionisation à pression atmosphérique en spectrométrie de masse. De la lumière dans la gamme de l'ultraviolet est utilisée pour ioniser les molécules. C'est une méthode d'ionisation sélective et sensible pour les composés aromatiques et polyaromatiques. L'APLI est la source d'ionisation dont le développement est le plus récent<sup>178,183</sup>.

### 3.2.2.2 Les différents analyseurs en spectrométrie de masse

L'analyseur est la partie du spectromètre séparant les molécules selon leur rapport  $m/z$ . Les paramètres qui caractérisent un analyseur sont la résolution, la gamme de rapport  $m/z$ , la vitesse d'acquisition, la précision en masse et la compatibilité avec les différentes sources. Parmi ces paramètres, la résolution se définit comme la capacité d'un instrument à distinguer entre eux deux signaux de rapport  $m/z$  voisins. Elle est définie comme étant le rapport  $\Delta m/m$ .  $m$  correspond à la masse de l'ion considéré,  $\Delta m$  correspond à la différence  $m/z$  entre l'ion considéré et son voisin le plus proche.  $\Delta m$  peut être défini comme la largeur à mi-hauteur de l'ion considéré. L'exactitude en masse correspond à la différence entre la masse exacte et la masse mesurée, elle s'exprime en ppm (partie par million), Équation 5.

$$\text{Erreur de mesure de masse} = \frac{M_{exp} - M_{th}}{M_{th}} \times 10^6$$

**Équation 5 : Exactitude en masse ( $M_{exp}$  : masse expérimentale ;  $M_{th}$  : masse théorique) en partie par million (ppm)**

Il existe une grande diversité d'analyseurs qui se caractérisent par des performances assez variées. On distingue les analyseurs à basse résolution tels que le triple quadripôle et la trappe ionique ou à haute résolution tels que les analyseurs à temps de vol ou encore les analyseurs à ultra-haute résolution tels que les analyseurs à transformée de Fourier (analyseur par résonance cyclotronique ou l'Orbitrap<sup>®</sup>). Le Tableau 1 illustre la diversité des performances de différents analyseurs.

	Résolution ( $m/\Delta m$ )	Gamme maximale $m/z$ (uma)	Exactitude masse (ppm)	en
Triple quadripôle	2 000	8 000	200	Basse résolution
Trappe ionique	5 000	6 000	200	Basse résolution
Temps de vol	20 000	50 000	2-10	Haute résolution
Orbitrap <sup>®</sup>	100 000	4 000	< 3	Ultra-haute résolution
Résonance cyclotronique	1 000 000	4 000	< 1	Ultra-haute résolution

Tableau 1 : Résolution, gamme maximale et exactitude en masse de principaux analyseurs en spectrométrie de masse

## 1 / L'analyseur triple quadripolaire

Cet analyseur est le plus répandu, son coût reste modéré par rapport aux autres technologies. Un quadripôle est un analyseur basse résolution, constitué de quatre électrodes de section hyperbolique entre lesquelles est appliquée une tension. Cette tension présente deux composantes dont une est constante ( $U$ ), l'autre alternative ( $V \cos \omega t$ ). Le potentiel appliqué est de signe opposé si l'on considère les électrodes adjacentes : il y a ainsi la création d'un champ quadripolaire<sup>184-187</sup>, Figure 25. Les molécules ionisées sont envoyées vers le centre du quadripôle. La modulation de la composante alternative du courant permet de guider les ions le long de l'axe du quadripôle. Les molécules ionisées ont un mouvement sinusoïdal ; celles qui entrent en résonance ont une trajectoire stable et seront détectées ; en revanche, celles qui n'entrent pas en résonance ont une trajectoire instable et ne seront pas détectées car elles heurtent les électrodes. Ces trajectoires sont gouvernées par l'équation de Mathieu<sup>188</sup>.

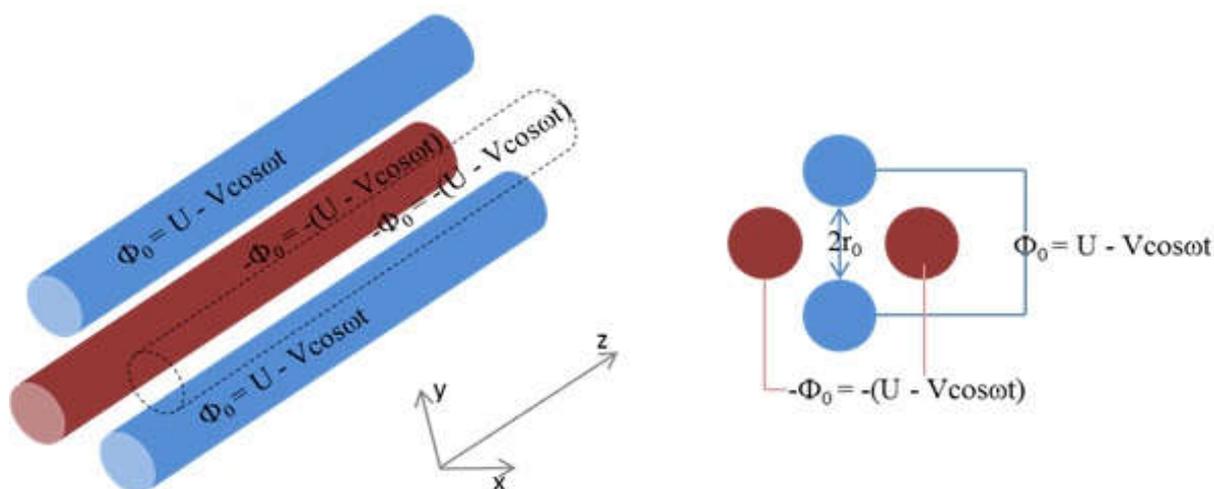


Figure 25 : Schéma d'un analyseur quadripolaire

L'association de trois quadripôles montés en série constitue un triple quadripôle. Le deuxième quadripôle est appelé cellule de collision, Figure 26. Le triple quadripôle permet d'effectuer des analyses avec différents modes d'acquisition, ce qui fait de cet analyseur un outil de choix notamment pour effectuer des analyses quantitatives.

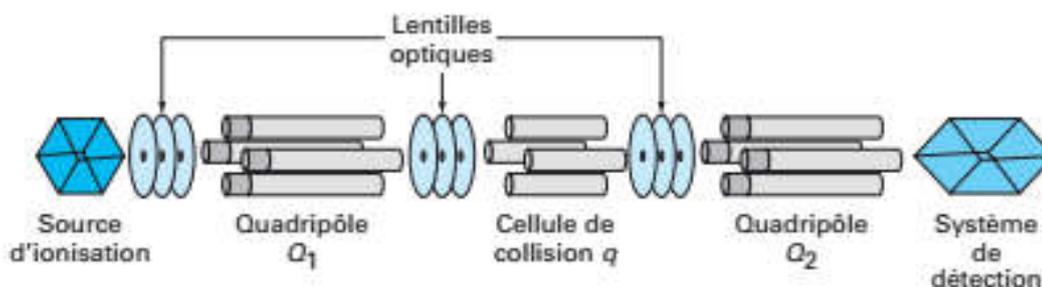


Figure 26 : Principe d'analyseur triple quadripolaire<sup>189</sup>

Un balayage de l'ensemble de la gamme  $m/z$  (mode Full-Scan) est utilisé pour analyser l'ensemble des ions produits dans la source sans fragmentation dans l'analyseur. Il permet d'obtenir la masse de chaque ion produit à partir d'un mélange inconnu. L'identification sera facilitée avec un système de chromatographie liquide en utilisant le temps de rétention de chaque composé. Ce type d'acquisition est peu sensible mais il constitue un passage obligé avant de réaliser des analyses plus ciblées. De plus, il est possible de sélectionner un ou plusieurs ions (Single Ion Monitoring ou SIM). Le spectromètre fonctionne ici comme un filtre de façon à ne détecter que des analytes de masse sélectionnée. Le gain en sensibilité est important puisque la durée de détection des ions est augmentée par rapport au mode Full-Scan. Le mode SIM est utilisé pour l'analyse de traces ou en toxicologie.

La fragmentation des ions parents implique au préalable une activation des ions dans la cellule de collision. La méthode la plus répandue est la fragmentation par la collision d'un gaz inerte (collision induced dissociation ou CID). Cette méthode repose sur la survenue d'une collision entre les ions quasi moléculaires et des molécules de gaz neutre (He, N<sub>2</sub>, Ar) qui conduisent à une conversion de l'énergie translationnelle en énergie interne. Lorsque cette énergie interne dépasse l'énergie de dissociation, l'ion se fragmente. L'énergie de collision peut se faire à haute énergie (de l'ordre du KeV) ou à basse énergie (de l'ordre de la centaine d'eV)<sup>190,191</sup>. La spectrométrie de masse en tandem peut être exploitée de trois façons différentes.

Le balayage d'ions fragments consiste à sélectionner un ion parent dans le premier quadripôle, cet ion est fragmenté dans la cellule de collision. Le dernier quadripôle peut fonctionner en mode Full-Scan, ce qui permet d'obtenir le spectre de masse de l'ion parent et de donner un certain nombre d'informations sur la structure de la molécule. Dans le cas d'une analyse quantitative, le dernier quadripôle fonctionne de manière à ne détecter qu'un seul ou plusieurs ions fragments ou mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) afin d'accroître la spécificité et la sensibilité aux faibles concentrations.

Le balayage des ions précurseurs consiste à faire fonctionner le premier quadripôle en mode Full-Scan tandis que le dernier quadripôle fonctionne de manière à sélectionner un seul ion fragment.

Par exemple, la recherche de la phosphatidyléthanolamine peut être ainsi effectuée en recherchant les molécules conduisant à la formation d'un fragment  $m/z$  140 (ion phosphoéthanolamine) en ionisation négative.

Enfin, le balayage de perte de neutre consiste à balayer en parallèle le premier et le troisième quadripôle en imposant un décalage en rapport  $m/z$  constant. On détecte ainsi tous les ions qui en se fragmentant dans la cellule de collision perdent un fragment caractéristique neutre. Ce mode de balayage est utilisé pour rechercher des molécules de fragmentation communes.

L'analyseur triple quadripolaire est largement répandu et utilisé dans de nombreux domaines (analyses pharmacologiques, toxicologiques). Les différents modes d'acquisition offrent une grande sensibilité et permettent d'obtenir des informations quantitatives et structurales sur des analytes. Cependant, le triple quadripôle est un analyseur de basse résolution qui peut présenter certaines limites, en particulier si les analyses portent sur la caractérisation et l'identification de l'ensemble des molécules d'un mélange complexe telles que celles retrouvées dans les échantillons biologiques. Les analyseurs à temps de vol, LTQ-Orbitrap™, ou les analyseurs par résonance cyclotronique, font partie d'une génération plus récente, à haute ou ultra-haute résolution et donnent accès aux masses exactes et constituent des outils d'identification plus puissants.

## **2 / Analyseurs à temps de vol**

Le principe de l'analyseur à temps de vol a été décrit en 1946 puis exploité commercialement en 1955<sup>192,193</sup>. Les ions sont dans un premier temps accélérés par une différence de potentiel appliquée entre deux électrodes et une grille d'extraction. A la sortie de cette cellule d'accélération, les ions possèdent tous la même énergie cinétique et pénètrent dans le tube de vol. Dans ce tube, il existe un vide poussé dans lequel il ne règne aucune forme de champ électromagnétique. Les ions sont séparés en fonction de leurs vitesses acquises. Les vitesses sont inversement proportionnelles à la racine carrée de leur rapport  $m/z$ . Ainsi, pour des ions ayant une même énergie cinétique, les ions les plus légers arrivent au détecteur plus rapidement que les ions les plus lourds, Figure 27.

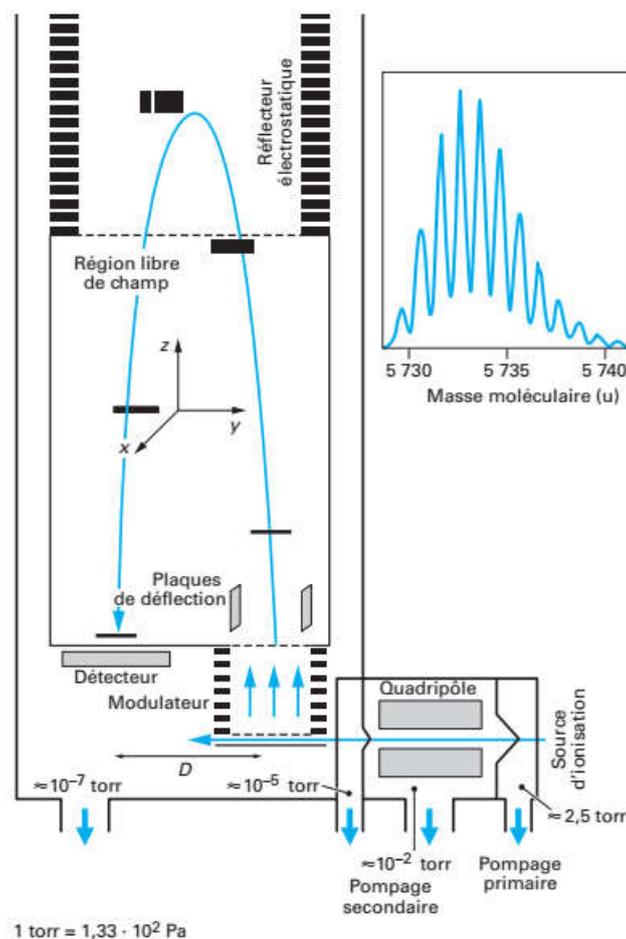


Figure 27 : Principe de fonctionnement d'un analyseur à temps de vol<sup>189</sup>

Des modifications ont été apportées pour améliorer la résolution de cet analyseur notamment avec l'ajout d'un réflectron. Il est constitué de lentilles électrostatiques sur lesquelles est appliquées un gradient de tension. Les ions qui entrent dans cette zone sont ralentis, s'arrêtent et font demi-tour. Pour un même rapport  $m/z$ , les ions présentant une énergie cinétique plus importante pénètrent plus loin dans le réflectron et allongent ainsi leur trajectoire, Figure 28. Ce dispositif permet la correction des temps d'arrivées des ions au détecteur<sup>194</sup>. Le gain en résolution se fait au détriment de la gamme de masse utilisable. En effet les  $m/z$  élevés pénètrent trop profondément et se perdront dans le réflectron.

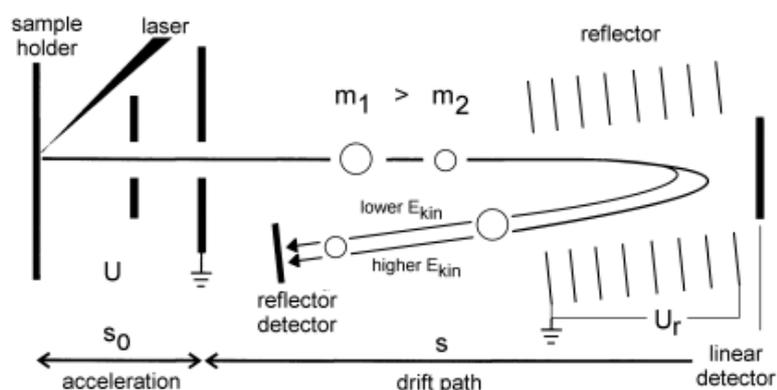


Figure 28 : Principe d'un analyseur à temps de vol équipé d'un réflectron<sup>164</sup>

Les analyseurs hybrides Qq-TOF (quadripôle-temps de vol), d'apparition récente, peuvent être considérés comme l'association d'un triple quadripôle dont le troisième quadripôle est remplacé par un analyseur à temps de vol. Ces appareils présentent de nombreux avantages. En effet, ils ont une sensibilité comparable aux triples quadripôles mais avec une résolution supérieure à 10 000 et une précision en masse de l'ordre de 5 ppm. Ils peuvent être couplés à des appareils de chromatographie en phase gazeuse ou liquide. Ils présentent aussi une vitesse d'acquisition de l'ordre de 300 ms, analyseurs qui sont donc compatibles avec les systèmes de chromatographie liquide les plus performants, tels que la chromatographie liquide ultra-haute pression pour laquelle la finesse des pics impose une fréquence d'acquisition du signal importante. Ces appareils sont très largement utilisés dans les études métabolomiques et lipidomiques<sup>195-201</sup>.

### 3/ Analyseur de masse à résonance cyclotronique à transformée de Fourier (FT-ICR)

L'analyseur FT-ICR repose sur le principe du cyclotron. La détection des ions est basée sur la mesure de la fréquence de rotation dans un champ magnétique intense. La cellule de détection est constituée de 6 plaques isolées les unes des autres. Chaque paire de plaques parallèles joue un rôle distinct entre le piégeage, l'excitation et la détection des ions. La cellule FT-ICR est placée dans un champ magnétique intense suivant l'axe parallèle aux plaques de piégeage. Les ions sont animés par une vitesse de rotation qui ne dépend que du rapport  $m/z$  et de l'intensité du champ magnétique.

L'application d'une différence de potentiel entre les plaques excitatrices permet de mettre en phase tous les ions de même rapport  $m/z$ . Le champ électrique ainsi produit entre les plaques excitatrices induit une accélération des ions et une augmentation du rayon de la trajectoire. Il est ainsi possible de sélectionner par ce procédé un certain domaine de la gamme de masse mais aussi de procéder à des expériences de spectrométrie de masse en tandem. En effet, l'énergie apportée par les impulsions du champ électrique peut induire des dissociations des molécules, Figure 29.

Le mouvement de rotation des différents ions produit un courant détecté par les plaques de détection. Le signal est décrit par une sinusoïde amortie en fréquence, la transformée de Fourier de ce signal fournit le spectre de fréquence cyclotronique qui est converti en spectre de masse.

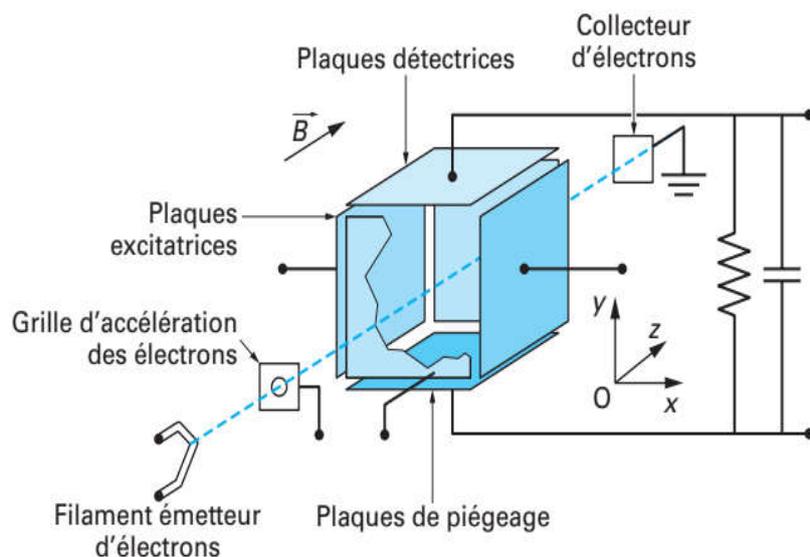


Figure 29 : Principe d'un analyseur de masse à résonance cyclotronique<sup>189</sup>

Les spectromètres de masse présentent un certain nombre d'avantages. La précision peut être inférieure à 1 ppm pouvant permettre une analyse élémentaire d'une molécule. La résolution peut atteindre 1 000 000, elle peut être mise à profit pour analyser des mélanges très complexes. Cette technologie offre la possibilité de réaliser des expériences de fragmentation en complément des mesures de la masse des ions moléculaires. Actuellement, il existe peu de démarches utilisant cette technique pour des applications liées à la métabolomique. En effet, le temps d'acquisition est assez long et ne permet pas de coupler cet analyseur avec les techniques d'UHPLC. De plus, cette technique nécessite l'utilisation d'un champ magnétique puissant (jusqu'à 15 Tesla) ; l'utilisation des aimants supraconducteurs ont un coût de maintenance et d'entretien important. Cependant, de plus en plus d'études présentent l'utilisation de cet analyseur parfois couplé à une méthode de chromatographie liquide<sup>202,203</sup>.

#### 4/ Orbitrap™

Le principe de l'analyseur Orbitrap™ a été mis au point sous forme d'une trappe électrostatique en 1923 par Kingdon<sup>202</sup> puis par Knight<sup>203</sup>. Ce sont les travaux de Makarov qui ont

contribué au développement de cette technologie à partir des années 1990<sup>206-211</sup>. L'Orbitrap™ se compose d'une électrode creuse externe et d'une électrode en forme de fuseau comme le montre la Figure 30.

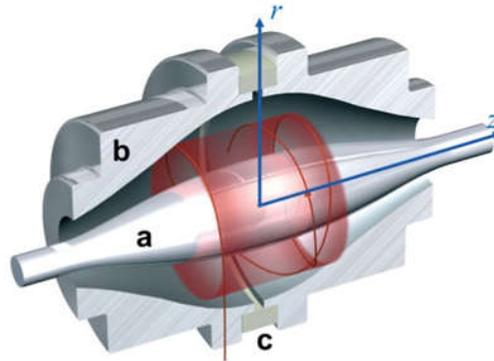


Figure 30 : Coupe transversale d'une cellule Orbitrap™<sup>207</sup>

Un champ électrique quadri-logarithmique est maintenu entre les électrodes. Les ions sont injectés tangentiellement à ce champ électrique. Le mouvement des ions dans l'Orbitrap™ adopte une trajectoire en spirale autour de l'électrode centrale. Il se compose d'un mouvement circulaire et axial. Ce dernier peut être décrit par l'Équation 6.

$$z(t) = z(0) \cos(\omega t) + \sqrt{\frac{2 E_z}{k}} \sin(\omega t) \text{ avec } \omega = \sqrt{k \frac{q}{m}}$$

Équation 6 : Equation en fonction du temps du mouvement axial des ions en mouvement dans l'Orbitrap™ (z(0) : amplitude axiale ; E<sub>z</sub> : énergie cinétique de l'ion ; q : charge de l'ion ; m : masse de l'ion)

Ainsi, la fréquence axiale ne dépend que du rapport m/z. Le mouvement des ions suivant l'axe z génère un courant induit enregistré par le détecteur qui est converti en spectre de fréquences grâce à une transformée de Fourier et donne accès au rapport m/z.

L'Orbitrap™ appartient au même titre que l'analyseur par résonance cyclotronique à la famille des spectromètres de masse à transformée de Fourier. Du point de vue de la résolution, l'analyseur Orbitrap™ est un appareil à très haute résolution mais ne dépasse pas l'analyseur par résonance cyclotronique. En effet, il a été montré que la résolution d'un analyseur par résonance cyclotronique atteint 100 000 et 60 000 pour un Orbitrap™<sup>209</sup> pour des ions m/z 400. Cependant, pour les valeurs hautes de rapports m/z (à partir de 800), l'Orbitrap™ offre de meilleures performances. En effet, la résolution pour un analyseur Orbitrap™ est inversement proportionnelle à la racine carrée de la masse tandis que pour l'analyseur par résonance cyclotronique la résolution est inversement proportionnelle à la masse, Équation 7.

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{1}{2\Delta\omega} \sqrt{\frac{kq}{m}}$$

Équation 7 : Expression de la résolution d'un analyseur Orbitrap™

Les spectromètres de masse Orbitrap™ commerciaux sont très souvent des appareils hybrides, c'est-à-dire couplés à d'autres analyseurs comme le piège ionique linéaire (Figure 31). Le LTQ-Orbitrap™ combine les avantages de la trappe linéaire (haute sensibilité, gamme dynamique élevée, réalisation d'analyses MS<sup>n</sup>) avec ceux d'un analyseur à transformée de Fourier (haute précision en masse et haute résolution). La trappe linéaire (LTQ ou linear trap quadrupole) est constituée de trois parties limitant la perte d'ions une fois le piégeage d'ions réalisé. Le LTQ dispose d'un mode d'acquisition automatique MS/MS permettant de sélectionner les ions précurseurs. Leur transfert est assuré de façon coaxiale depuis le LTQ par un octopôle, qui conduit les ions dans un piège intermédiaire : la C-Trap. Les ions sont ensuite pulsés vers l'Orbitrap™. Enfin, cet appareil est doté d'une cellule couplée à la C-Trap permettant de réaliser des fragmentations de plus haute énergie.

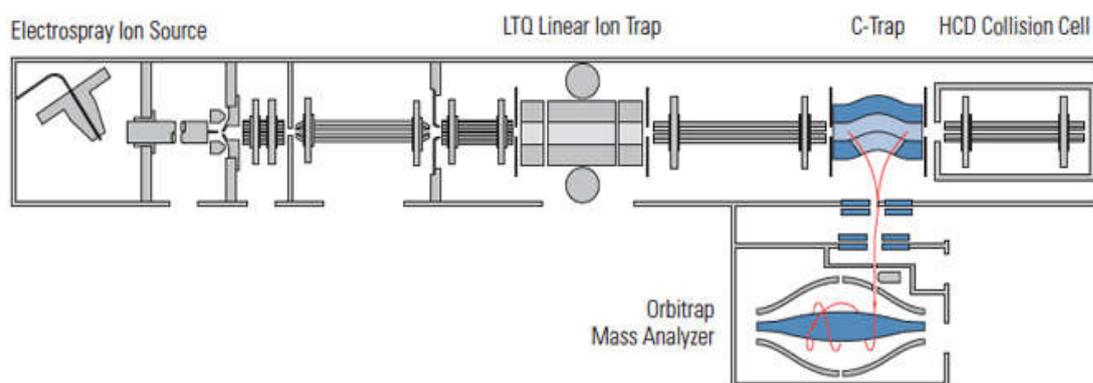


Figure 31 : Schéma d'un LTQ-Orbitrap®

Ainsi, il existe une grande diversité de mise en œuvre de la spectrométrie de masse. En effet, les différentes sources d'ionisation permettent de répondre aux caractéristiques physico-chimiques des molécules à analyser. Les innovations technologiques concernant les analyseurs ont permis de répondre aux besoins d'un pouvoir de résolution toujours plus grand. En effet, ils permettent de distinguer de nombreuses espèces contenues dans les matrices complexes comme les échantillons biologiques. De plus, il est particulièrement difficile d'élucider de façon certaine la structure de composés lipidiques. En effet, pour une même masse, il peut exister plusieurs espèces moléculaires différentes (chaînes d'AG, position des doubles liaisons, configuration *sn1/sn2*). Le choix d'un spectromètre de masse est de toute évidence multicritères et va dépendre du coût d'achat, des

caractéristiques des locaux à respecter, de la formation du personnel et de la maintenance. C'est pourquoi les spectromètres à transformée de Fourier sont beaucoup moins utilisés par rapport au triple quadripôle par exemple.

Cependant, ce choix doit être principalement guidé par les objectifs des études à réaliser. Actuellement, l'analyse des lipides est guidée par la recherche d'un pouvoir de résolution important et en même temps l'obtention d'informations sur la structure des lipides. C'est pourquoi les spectromètres de masse hybrides à transformée de Fourier (LTQ-Orbitrap™) sont des instruments particulièrement efficaces pour effectuer des analyses lipidomiques non ciblées. Au cours de mes travaux de thèse, des analyses préliminaires ont été réalisées avec un analyseur triple quadripôle et par la suite le spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap™ a été utilisé.

## **4 De l'analyse des lipides à la lipidomique**

### **4.1 Les biomarqueurs**

Un biomarqueur est défini par le National Health Institute comme étant une caractéristique biologique, objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique<sup>212</sup>. La glycémie est un biomarqueur reconnu pour mesurer la sévérité d'un diabète et pour évaluer l'efficacité du traitement. Le dosage d'un biomarqueur peut correspondre à des procédures simples comme celui de la glycémie, du cholestérol ou d'identifier une mutation spécifique du génome.

Dans une publication de 1993, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) identifie l'enjeu de pouvoir prédire les effets toxiques de substances chimiques sur les êtres vivants, et souligne que les modèles de laboratoire sont insuffisants. De plus, l'utilisation d'enquêtes épidémiologiques rétrospectives pour évaluer un effet toxique sur les êtres humains présente de nombreux biais, notamment parce qu'il est difficile de connaître objectivement le degré d'exposition des individus<sup>213</sup>. L'intérêt des biomarqueurs réside dans leur capacité à être corrélés avec un effet biologique en fonction du degré d'exposition. La détection précoce des effets toxiques en cas d'exposition est alors envisageable ainsi qu'une estimation des variabilités interindividuelles.

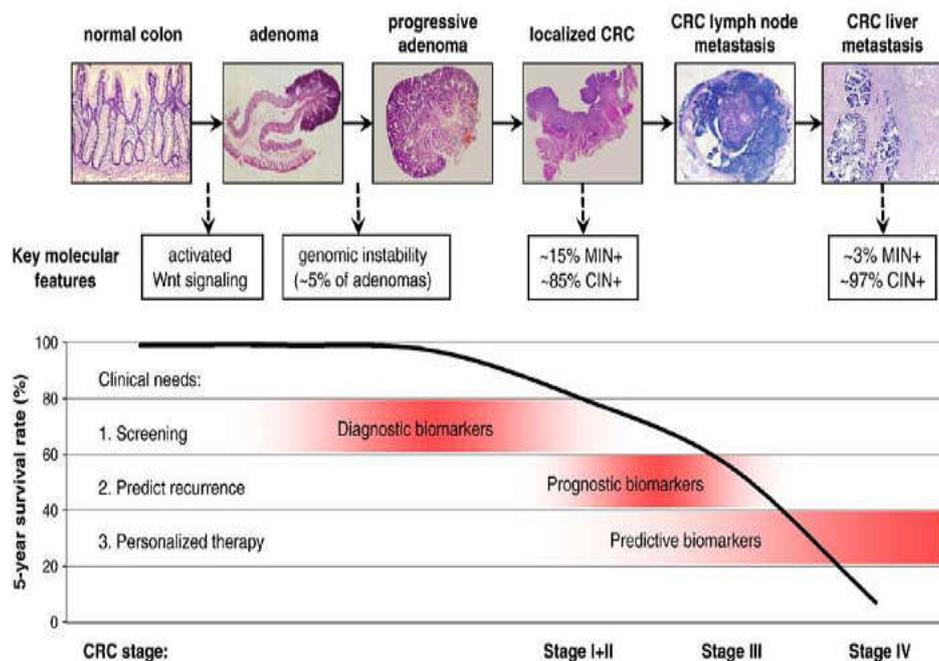
L'OMS définit trois types de biomarqueur reportés dans le Tableau 2.

<b><u>Biomarqueurs d'exposition</u></b>	Indicateur de la présence dans un organisme d'une substance exogène
<b><u>Biomarqueurs d'effet</u></b>	Indicateur de l'existence d'une interaction avec l'organisme provoquant des effets toxiques ou non.
<b><u>Biomarqueurs de susceptibilité</u></b>	Indicateur des différences interindividuelles (innées ou acquises) dans la réponse à une exposition d'un xénobiotique.

**Tableau 2 : Différents types de biomarqueurs selon l'Organisation mondiale de la santé**

L'identification de biomarqueurs peut potentiellement apporter une amélioration de l'ensemble de la prise en charge thérapeutique des patients. Sur le plan du diagnostic, les biomarqueurs peuvent permettre la simplification des actes médicaux (coloscopie *versus* prise de sang) et donner des informations sur l'évolution de la maladie du patient au moment de son bilan pré-thérapeutique. Cette recherche peut déterminer des critères objectifs d'efficacité d'un traitement avant administration et ainsi optimiser le rapport bénéfice/risque pour chaque patient ou bien découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

La Figure 32 représente les différents stades histologiques d'une tumeur colorectale dans sa partie supérieure. On observe que chaque modification d'aspect cytologique est caractérisée par l'activation de voie de signalisation ou de l'expression d'une molécule particulière. Ces modifications sont mises en relation avec un critère clinique, à savoir la survie globale à cinq ans.



**Figure 32 : Les différents types de biomarqueurs utilisables en médecine humaine mise en relation avec le processus de cancérogenèse de cellules coliques<sup>214</sup>**

Enfin, face aux coûts de développement d'un nouveau traitement, l'industrie est à la recherche de marqueurs permettant d'orienter leur recherche. En effet, seulement 1 à 2 médicaments sur 10 entrant en développement seront mis sur le marché. Cette pression est augmentée par les organismes payeurs qui souhaitent obtenir une évaluation objective d'une meilleure efficacité avant de rembourser une nouvelle thérapeutique souvent plus coûteuse<sup>215</sup>.

D'un point de vue analytique, un biomarqueur doit être mesuré objectivement, c'est-à-dire avec une précision et une reproductibilité suffisantes. De plus, il doit être évalué comme un indicateur de processus physiologiques ou pathologiques, ou être capable de mesurer la réponse thérapeutique à un nouveau traitement. Les biomarqueurs les plus couramment recherchés sont les protéines, les acides nucléiques (ADN et ARN), de petites molécules ou leurs métabolites.

## 4.2 Les sciences « omiques »

Etymologiquement, le suffixe « omique » a pour origine le mot « OM » tiré du sanscrit désignant la complétude et la plénitude. Les sciences « omiques » consistent à identifier l'ensemble des espèces moléculaires constitutives d'un organisme vivant et plus particulièrement les modifications de composition en réponse à une altération du métabolisme. Ces recherches consistent à caractériser l'ensemble d'un système biochimique. Les différentes disciplines comprennent notamment la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique<sup>216</sup>, Figure 33.

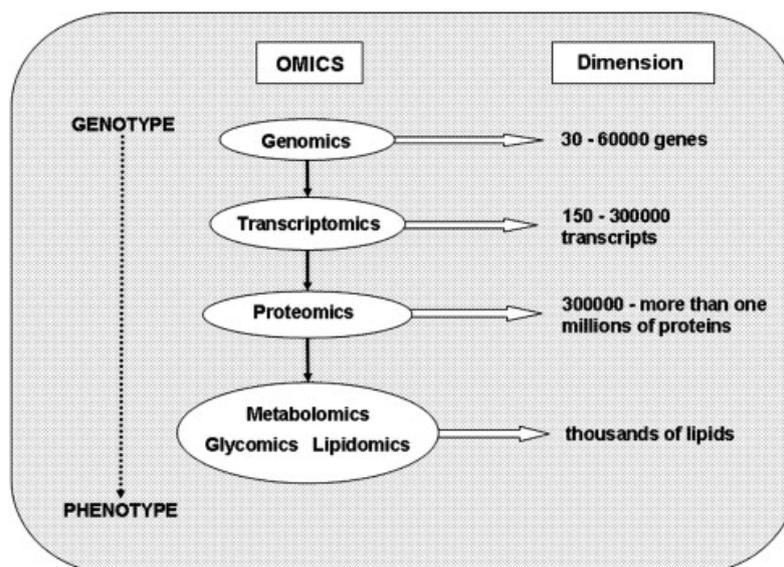


Figure 33 : Différents niveaux des sciences « omiques » ainsi qu'un ordre de grandeur du nombre d'espèces dans chaque classe<sup>217</sup>

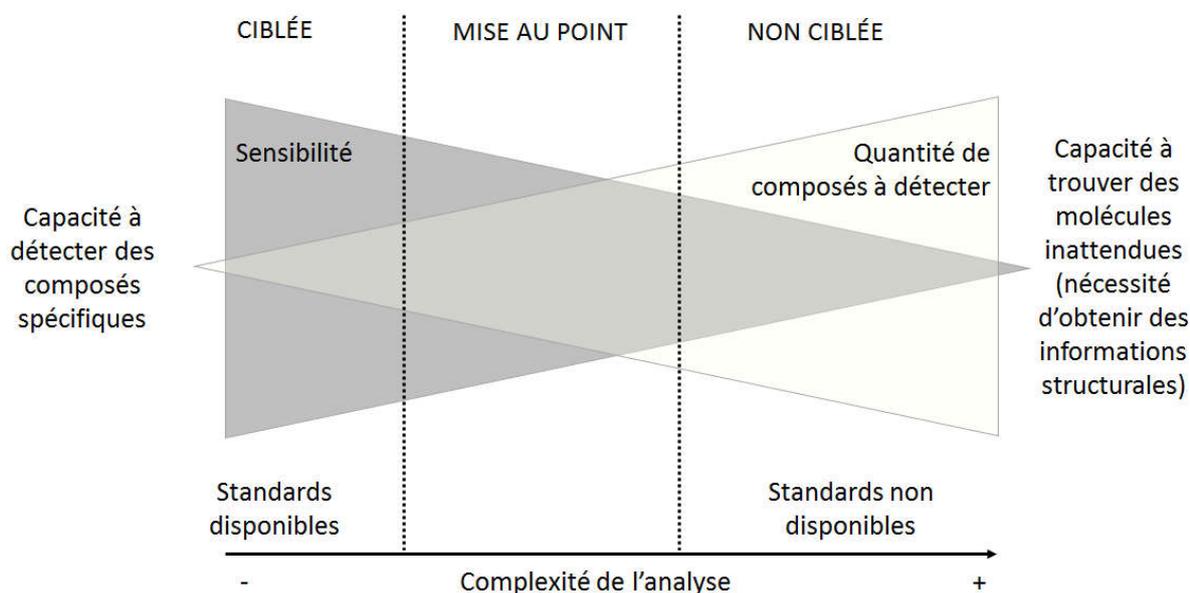
Les sciences « omiques » ont considérablement modifié les méthodes d'exploration des phénomènes biologiques. En effet, cette approche globale génère une quantité d'informations gigantesque à des niveaux biologiques très variés : du séquençage de l'ADN en passant par l'expression des protéines ou la description des modifications des structures métaboliques. De plus, il n'est pas forcément utile de formuler une hypothèse de départ pour démarrer ses recherches. Il est par contre nécessaire de définir des groupes d'étude. Les données recueillies permettent ainsi de formuler des hypothèses biologiques et de les tester. Cette nouvelle approche ouvre la porte à de nombreuses découvertes sur les mécanismes physio-pathologiques<sup>218</sup>.

La métabolomique présente certains aspects singuliers. En effet, elle est placée à la fin de la cascade omique, caractérisée par une grande complexité et comprenant les acides nucléiques, les acides aminés, les sucres et les lipides. De plus, cette diversité d'espèces moléculaires peut varier dans le temps et dans l'espace et rendre plus complexe le défi analytique. Pour toutes ces raisons, aucune méthode de bioanalytique ne peut caractériser l'ensemble du métabolome<sup>136</sup>. Cependant, l'ensemble des techniques précédemment exposées (chromatographie et spectrométrie de masse notamment) grâce à leur diversité de mise en œuvre et la possibilité de réaliser des analyses à haute fréquence peuvent répondre aux défis des analyses métabolomiques.

Différentes stratégies analytiques sont possibles en métabolomique, comme le montre la Figure 34. On distingue les analyses ciblées qui ont pour objectif d'identifier la structure et de quantifier quelques lipides d'intérêt connus dans un mélange complexe. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem avec la réalisation d'une fragmentation permet d'observer les ions fragments spécifiques d'une molécule. Les modes SRM (Selected Reaction Monitoring) et MRM (Multiple Reaction Monitoring) sont largement utilisés pour observer les ions parents recherchés avec les ions fragments spécifiques. En revanche, les analyses non ciblées ont pour objectif d'apprécier la variabilité de composition qualitative et/ou quantitative de la totalité des lipides ou d'une fraction lipidique donnée dans plusieurs groupes d'échantillons. Les analyses en spectrométrie de masse peuvent faire suite à une séparation chromatographique, pour faciliter la lecture des spectres de masse ou l'échantillon peut être injecté directement dans la source ou « shotgun ». L'analyse « shotgun » présente l'avantage de supprimer l'étape de séparation chromatographique et peut être utilisée en mise au point lors d'analyses non ciblées ou ciblées.

Enfin l'analyse en mise au point est utilisée pour l'étude d'une catégorie de lipides. Cette méthode utilise les outils cités précédemment avec différents modes d'acquisition comme la perte de neutre ou le scan d'un ion précurseur lorsqu'un fragment spécifique de la classe lipidique est connu.

L'utilisation d'une méthode de chromatographie en phase inverse peut être utilisée pour séparer les différentes espèces moléculaires étudiées.



**Figure 34 : Représentation schématique des différentes stratégies utilisées en métabolomique et la quantité de biomarqueurs potentiellement mise en évidence<sup>217</sup>**

Les analyses lipidomiques ont été appliquées à de nombreuses situations pathologiques comme la maladie d'Alzheimer, les neurosciences ou l'oncologie<sup>219-224</sup>. Dans le domaine des maladies cardio-vasculaires, les approches « omiques » laissent entrevoir de nouvelles perspectives pour comprendre les phénomènes physio-pathologiques associés. Des publications récentes soulignent l'intérêt d'étudier les modifications du lipidome du macrophage, cellule qui joue un rôle très important dans les processus inflammatoires et la constitution d'une plaque d'athérome menant à l'athérosclérose<sup>225-228</sup>.

Les études métabolomiques comportent plusieurs étapes et font appel à des compétences très diversifiées, Figure 35. Dans un premier temps, il est nécessaire de situer le contexte de l'étude pour établir la nature et la disponibilité de l'échantillon à analyser (cellules, tissus, fluides biologiques). Ces points sont déterminants pour choisir la stratégie de préparation de l'échantillon biologique et la technique analytique mise en jeu lors de l'étude. Enfin, l'ensemble des innovations technologiques en spectrométrie de masse et en chromatographie liquide ont permis d'accroître les fréquences d'acquisition des appareils et leur capacité d'analyse des mélanges complexes. Les données chimiques obtenues sont donc considérables surtout dans le cas des études non ciblées. Il est donc particulièrement difficile d'extraire et d'interpréter les informations pertinentes. Le traitement statistique des données chimiques obtenues lors des analyses métabolomiques est connu sous le nom de chimiométrie.

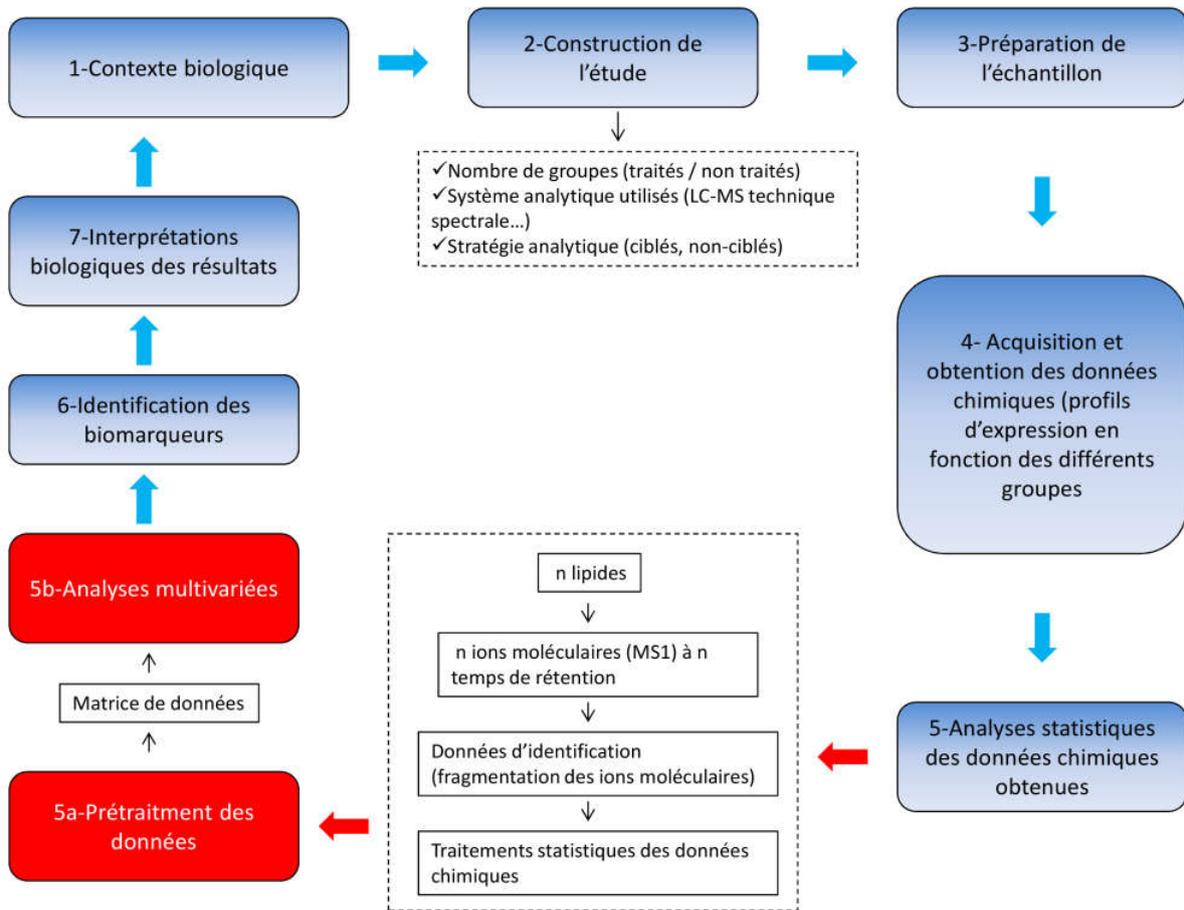


Figure 35 : Les différentes étapes d'une étude lipidomique et les objectifs de la chimiométrie

### 4.3 Traitement des données des analyses lipidomiques

Dans la plupart des cas, les études « omiques » permettent d'établir des comparaisons entre un groupe d'échantillons dit « témoin » et un groupe ayant subi une modification de son métabolisme. Dans ce cas, le but des analyses chimiométriques est de construire un modèle mathématique capable de distinguer les différents groupes d'échantillons et d'obtenir des informations sur les variables responsables de ces différences. Les données chimiques sont souvent représentées selon un tableau de valeurs ou plus précisément une matrice (Tableau 3). On indique en ligne les échantillon et en colonne les variables.

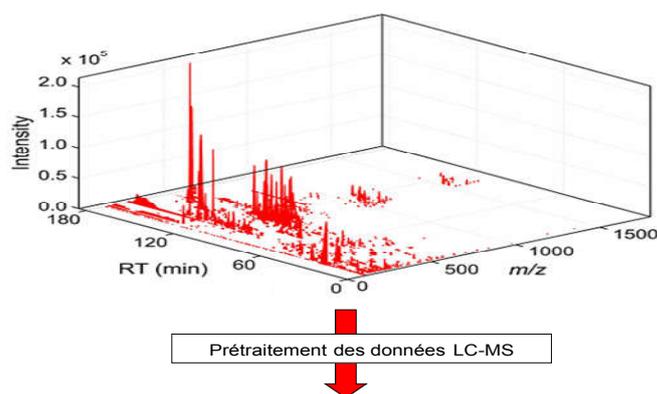
	Variable 1	Variable 2	Variable 3	...	Variable n
Échantillon 1					
Échantillon 2					
...					
Échantillon n					

Tableau 3 : Représentation générale des données chimiques

Ces variables peuvent prendre différentes formes comme la mesure d'un spectre, d'une image ou bien l'appartenance à une classe. La structure de ces données est donc multivariée, c'est-à-dire que le nombre de variables est très supérieur au nombre d'observations ou d'échantillons analysés. Cette notation matricielle des données chimiques représente un des fondements de la chimiométrie. L'analyse des données obtenues par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide ou gazeuse présente un certain nombre de particularités qu'il est important de connaître pour comprendre l'ensemble des étapes qui sont nécessaires au traitement de ces données.

#### 4.3.1 Particularités des données obtenues en chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

La première caractéristique est que les données obtenues en LC-MS sont caractérisées par trois paramètres : le rapport  $m/z$ , le temps de rétention et l'intensité de l'ion. Afin de décrire ces données dans une matrice à 2 dimensions, les variables sont définies comme des couples (temps de rétention ; rapport  $m/z$ ) comme le montre la Figure 36. Pour chaque variable de chaque échantillon correspond une valeur d'intensité (hauteur de pic). Ainsi, d'une structure de données brutes en trois dimensions, le prétraitement avec la construction des couples [temps de rétention ; rapport  $m/z$ ] permet de construire une matrice bidimensionnelle. Cette étape est bien évidemment dépendante des performances de la méthode et du couplage, c'est-à-dire qu'une attention particulière sera donnée aux performances de la technique chromatographique (largeur des pics) et à la résolution de l'analyseur utilisé pour effectuer la détection en masse. Par exemple, il est possible de générer un grand nombre de variables avec des rapports  $m/z$  très proches, correspondant à des écarts inférieurs à la résolution du spectromètre de masse.



	$(Tr_1 ; m/z_1)$	$(Tr_2 ; m/z_2)$	$(Tr_3 ; m/z_3)$	...	$(Tr_n ; m/z_n)$
Échantillon 1					
Échantillon 2					
Échantillon 3					
...					
Échantillon n					

Figure 36 : Représentation en 3 dimensions des données LC-MS et de la notation matricielle obtenue après prétraitement<sup>229</sup>

La définition d'un niveau à partir duquel le signal observé est considéré comme du bruit de fond est une étape indispensable. En effet, comme toute technique analytique, la modélisation du bruit influence l'interprétation statistique des données. Cette définition du bruit de fond peut se faire suivant deux modalités : en fonction d'un niveau d'intensité minimal attribué aux pics  $m/z$  et/ou d'une durée de présence minimale de l'ion. Une évaluation prudente du bruit de fond est nécessaire pour effectuer un premier filtre des données LC-MS. Il peut être parfois nécessaire d'évaluer la variabilité du bruit de fond au cours du chromatogramme pour éventuellement définir des fenêtres de niveaux de bruits ou de définir de façon plus globale un bruit moyen.

Les méthodes d'ionisation, en particulier celles à pression atmosphérique, peuvent produire plusieurs ions pour une même molécule. En effet, plusieurs adduits peuvent être formés pour une même molécule. A titre d'exemple, une PC peut être ionisée d'au moins quatre façons différentes. On peut donc observer des adduits acide acétique, chloré, nitrate ou des ions fragments déméthylés. Ainsi pour une même molécule, on peut observer plusieurs valeurs  $m/z$  correspondant à une même molécule. Ces différents adduits sont formés notamment à cause de la composition de la phase mobile (adduits acide acétique) ou à la présence d'éléments parasites (adduits chloré ou nitré) ou à la présence d'un phénomène de fragmentation des ions moléculaires dans la source. Ce dernier est particulièrement important pour les sources APCI ou APPI. Le principal inconvénient est que certaines variables créées sont redondantes et ne sont pas forcément pertinentes à analyser d'un point de vue chimique. Cependant, elles sont le reflet de l'ensemble du processus de séparation-ionisation-détection. La construction de la matrice de données à partir des données obtenues en LC-MS est appelée

prétraitement. Cette détection automatique des espèces ionisées est connue sous le nom de prétraitement qui comporte un certains nombre d'étapes.

### 4.3.2 Le prétraitement des données LC-MS

Le prétraitement des données de LC-MS peut être divisé en 8 étapes comme représenté sur la Figure 37. De nombreux logiciels sont caractérisés par le type de format pris en charge et les algorithmes utilisés. Ils peuvent être payants et fournis par les constructeurs, ou gratuits. Mzmine 2 est un exemple de logiciel dont il est possible de modifier les algorithmes<sup>230-233</sup>.

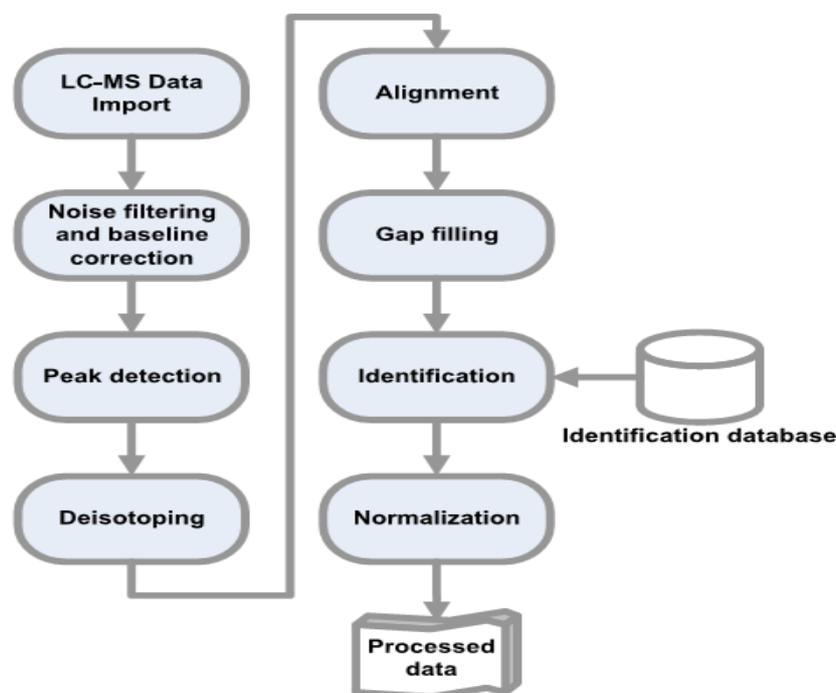


Figure 37 : Les différentes étapes nécessaires au prétraitement des données LC-MS<sup>233</sup>

Dans la plupart des cas, lors d'une acquisition, le spectromètre de masse génère un fichier qui est le plus souvent non compatible avec ces logiciels de prétraitement. Une conversion des fichiers est alors indispensable. Les formats universels pris en charge par l'ensemble des logiciels sont notamment le « NetCDF » ou « mZML ».

Entre l'import des données et leur analyse, le prétraitement consiste à obtenir un jeu de données comparables entre les différents échantillons issus des différents groupes permettant en particulier de s'affranchir de la variabilité instrumentale.

Après le chargement des données dans le logiciel, la première étape consiste à effectuer la détection des pics. Plusieurs approches sont possibles. En effet, la détection des pics peut être effectuée en fonction d'une fenêtre  $m/z$  (logiciel XCMS) ou suivant deux dimensions : temps de rétention et rapport  $m/z$  (logiciel Mzmine). Récemment, un nouvel algorithme « Gridmass » a été ajouté dans Mzmine, qui est un algorithme de détection des pics en deux dimensions<sup>234</sup>. Ces logiciels suivent les évolutions technologiques en spectrométrie de masse comme l'utilisation des spectromètres à ultra-haute résolution. Ils permettent de répondre aux différentes caractéristiques du signal résultant des systèmes de couplage : niveau de bruit, résolution.

Dans un deuxième temps, une étape d'alignement est essentielle pour pouvoir comparer les différents métabolites entre les échantillons. Cet alignement est nécessaire pour s'affranchir de la variabilité de rétention d'une analyse à une autre. Il est réalisé par le calcul d'un indice de vraisemblance entre les pics. Ce calcul est basé sur l'écart de masse et de temps de rétention entre les pics par rapport à une tolérance définie.

Enfin, l'étape de remplissage des données manquantes permet de retrouver les signaux manquants en les recherchant dans les données brutes. Les différents algorithmes utilisables dans le logiciel Mzmine sont représentés dans le Tableau 4.

Ces différentes étapes présentées ci-dessus sont incontournables pour effectuer le prétraitement des données LC-MS dans le cadre d'une étude métabolomique. Il existe également des étapes dites « facultatives » comme la normalisation ou le regroupement des variables issues d'un même isotope. L'objectif de la normalisation est d'atténuer les biais expérimentaux tout en conservant les variations dues aux effets biologiques.

En ce qui concerne la normalisation, il existe deux méthodes principales pour normaliser les intensités des ions. La première consiste à utiliser des méthodes statistiques telles que la normalisation en utilisant l'intensité moyenne globale ou en utilisant un maximum de vraisemblance. Une autre approche consiste à utiliser des composés de référence pour normaliser sur l'ensemble du chromatogramme. Cette dernière méthode peut sembler la plus intéressante. Il est cependant difficile de déterminer la nature des composés à utiliser, ces derniers peuvent perturber le processus d'ionisation des composés d'intérêt.

De plus, l'élimination des différents isotopes permet de simplifier la population de différentes variables contenues dans la matrice de données. Cette étape peut être intéressante lorsque la quantité

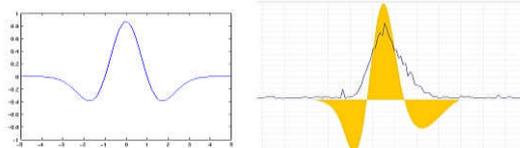
de données est très importante. Elle ne permet pas de s'affranchir de la redondance du signal en masse. En effet, les différents adduits ou fragments sont formés dans la source. Seule l'étude de la fragmentation des espèces moléculaires et l'identification des composés permet de connaître objectivement ces phénomènes. Il est donc relativement difficile de choisir une méthode de normalisation. La reproductibilité des extractions peut être une première réponse, tant au niveau du protocole qu'au niveau de la quantité de matrice biologique utilisée (volume de plasma recueilli, quantité de tissu, nombre de cellules). En effet, un échantillon plus concentré fera apparaître des tendances dans les échantillons qui se révéleront non pertinentes.

Il est particulièrement important de placer des contrôles dans la séquence d'analyse. Un blanc d'extraction permet d'observer la présence d'impuretés, d'évaluer le niveau de bruit moyen au cours du chromatogramme. De plus, les mélanges de standards sont utilisés pour évaluer les temps de rétention pour chaque classe lipidique mais aussi pour effectuer une quantification dans les échantillons biologiques. Enfin, il est possible d'effectuer un échantillon moyen correspondant à un mélange équivolumétrique des échantillons biologiques et d'en effectuer des dilutions successives. L'analyse de ces échantillons permet de vérifier la relation existant entre le signal obtenu pour une espèce ionisée et son niveau de dilution<sup>235</sup>.

## Les étapes fondamentales

### Détection du spectre de masse

<b>Centroïde</b>	Chaque ion est détecté dans chaque spectre de masse : Donnée centroïde
<b>Masse exacte</b>	Pour les données de haute résolution
<b>Maximum local</b>	Détecte tous les maximums locaux, à l'exception des signaux en dessous du niveau de bruit donné
<b>Recursive Threshold</b>	Adapté pour les données de haute résolution ayant beaucoup trop de bruit pour utiliser la masse exacte
<b>Transformation en ondelettes</b>	Les pics sont décrits en ondelettes. La valeur $m/z$ finale est calculée comme une moyenne des valeurs entourant les données <sup>236</sup>
<b>Grid mass</b>	Détection des pics en considérant les deux dimensions des données LC-MS <sup>234</sup>



### Déconvolution

<b>Baseline cut off</b>	Simple d'utilisation
<b>Noise amplitude</b>	Similaire au « base line cut off » mais permet de régler l'amplitude du niveau de bruit
<b>Savitsky-Golay</b>	Cette méthode utilise l'algorithme de Savitsky-Golay <sup>237,238</sup>
<b>Local min search</b>	Pics reconnus s'ils remplissent les exigences minimales de hauteur et de durée

### Alignement

<b>Join Aligner</b>	Calcul du score de ressemblance
<b>RANSAC</b>	L'alignement de chaque échantillon se fait à partir de la liste des pics principaux du premier échantillon puis il y a une correction de tous les écarts, linéaires ou non, dans une fenêtre de temps de rétention définie

### Remplissage des données manquantes

<b>Peak finder</b>	Les pics sont alignés en fonction d'une fenêtre de temps de rétention et de masse
<b>Same RT et <math>m/z</math></b>	Cette méthode remplit les lacunes dans chaque ligne de la liste pic en utilisant le même $m/z$ et la même plage de temps de rétention que d'autres sommets de la ligne

## Les étapes facultatives

<b>Desisotoping</b>	Il permet d'estimer les pics en fonction de leur distribution isotopique
<b>Normalisation</b>	Normalisation linéaire (intensité moyenne, intensité moyenne au carré, intensité maximale ou la somme de l'intensité totale). Normalisation par un étalon interne

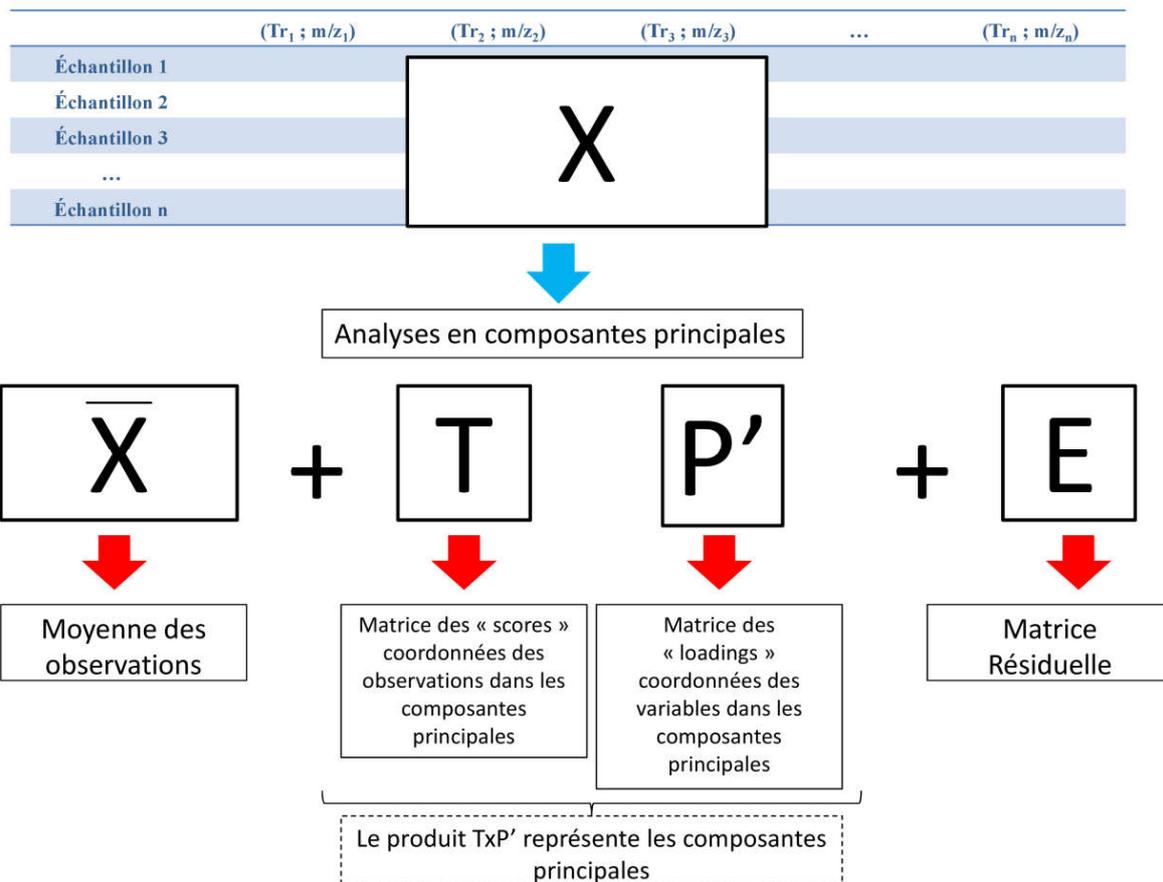
Tableau 4 : Différentes étapes du prétraitement disponibles sur Mzmine avec les différents algorithmes disponibles

### **4.3.3 Les analyses chimiométriques**

Les statistiques univariées sont classiquement utilisées pour déterminer des corrélations entre deux variables quantitatives ou pour effectuer une analyse de variance entre une variable qualitative (appartenance à un groupe) et une variable quantitative. Le choix des différents tests a été largement décrit et dépend notamment de la loi de distribution. Les données issues de la spectrométrie de masse couplées à la chromatographie liquide sont de natures multivariées. L'application des tests univariés est possible mais ne prend pas en compte les différentes corrélations qu'il peut exister entre les variables et peut conduire à des résultats faussement significatifs. Les statistiques multivariées permettent une réduction de la dimensionnalité pour visualiser l'information cachée. La chimiométrie regroupe les méthodes d'analyses discriminantes, des plans d'expériences et des analyses multivariées<sup>239-241</sup>.

#### **4.3.3.1 Les analyses multivariées**

Le principe est de réduire la dimensionnalité des données afin de pouvoir détecter des tendances au sein des échantillons. L'analyse en composante principale (ACP) est une méthode qui recherche une combinaison linéaire des variables de départ décrivant la dispersion des échantillons. Son calcul n'est pas orienté, autrement dit il est non supervisé. La combinaison linéaire des variables de départ est calculée pour maximiser la variance ou la dispersion entre les échantillons et en même temps pour minimiser la matrice résiduelle. Les composantes principales sont orthogonales les unes des autres et permettent le classement décroissant des sources de variance. La Figure 38 résume le principe du calcul de l'analyse en composante principale.



**Figure 38 : Principe de la décomposition matricielle de la matrice de X lors d'une analyse en composantes principales (la notation « ' » représente la matrice transposée)**

Souvent, le calcul de deux ou trois composantes résume l'information contenue dans les données. Les échantillons (scores) et les variables (loadings) peuvent être projetés dans l'espace défini par les composantes qui montrent les directions de dispersion des échantillons et des variables qui sont responsables de cette organisation<sup>242-244</sup>.

La méthode des moindres carrés partiels (PLS) est une variante de l'ACP dont le principe est de relier les données ( $X$ ) à une réponse ( $Y$ ). A la différence de l'ACP, la PLS est un calcul orienté puisque les ( $Y$ ) sont connus. Le plus souvent, l'objectif de la PLS est de pouvoir prédire la réponse ( $Y$ ) d'un deuxième set de données<sup>245-247</sup>.

L'emploi des statistiques multivariées a pour but de détecter au sein de l'ensemble des variables explicatives des variations d'intensité responsables des différences observées entre les échantillons. A l'évidence, ces traitements statistiques sont appliqués sur des données qui minimisent le bruit de fond et les artéfacts pour ainsi éviter d'orienter à tort le calcul des composantes. Plusieurs outils ont été préalablement cités comme la nécessaire reproductibilité des extractions en phase pré-analytique, l'utilisation éventuelle d'un étalon interne ou encore la nécessité de réaliser un mélange de

l'ensemble des groupes d'échantillons pour éventuellement corriger les variations de l'instrumentation.

De plus, lors de l'utilisation d'outils de statistique multivariée, il est très souvent effectué une transformation des données de la matrice X ou mise à l'échelle. Cette étape a pour but de diminuer les variations observées au sein des données brutes. Le centrage des données consiste à soustraire aux données brutes la moyenne de chaque descripteur. Ainsi, chaque variable présente une moyenne égale à zéro et diminue le poids des concentrations entre les métabolites. De plus, il est possible de diviser chaque variable par un facteur de mise à l'échelle ou « scaling ». L'objectif est de corriger les différences d'intensités observées en exprimant les données en intensité relative. Le facteur de mise à l'échelle peut être basé sur l'utilisation d'un facteur de dispersion (écart type) ou l'utilisation d'un facteur relatif à la taille de l'échantillon (la moyenne par exemple). Enfin, les transformations non linéaires (log ou racine carré) sont possibles. Cela permet de diminuer l'hétéroscédasticité des différents descripteurs si l'écart type est relativement homogène<sup>248,249</sup>. Les différentes méthodes de mise à l'échelle et de transformation des données sont présentées, Tableau 5.

Nom et formule	Objectif	(1) Avantages (2) Inconvénients
<b>Centré</b> $\tilde{x} = x - \bar{x}$	Concentrer l'analyse sur les différences et non sur les similitudes entre les données	(1)- Eliminer les décalages dans les données (2)- Insuffisant en cas d'hétéroscédasticité dans les données
<b>Centré réduit</b> $\tilde{x} = \frac{x - \bar{x}}{s}$	Comparer les variables suivant les corrélations	(1)- Toutes les variables ont la même importance (2)- Augmentation des erreurs de mesure
<b>« Range scaling »</b> $\tilde{x} = \frac{x - \bar{x}}{X_{max} - X_{min}}$	Comparer les métabolites suivant la gamme de la réponse biologique	(1)- Toutes les variables ont la même importance (2)- Augmentation des erreurs de mesure sensibles aux échantillons atypiques ou « ouliers »
<b>« Pareto scaling »</b> $\tilde{x} = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{x}}$	Diminuer l'importance relative des valeurs élevées sans modifier la structure des données	(1)- Reste proche des données originales (2)- Sensible aux variations importantes
<b>« Vast scaling »</b> $\tilde{x} = \frac{x - \bar{x}}{X_{max} - X_{min}} * \frac{\bar{x}}{s}$	Focaliser sur les variables qui présentent de faibles fluctuations	(1)- Vise la robustesse dans les données (2)- Insuffisant, si les variations sont importantes dans le cas des analyses non supervisées
<b>« Level scaling »</b> $\tilde{x} = \frac{x - \bar{x}}{\bar{x}}$	S'intéresser aux réponses relatives	(1)- Intéressant pour l'identification des biomarqueurs (2)- Augmente les erreurs de mesure
<b>Transformation log</b> $\tilde{x} = \log x$	Corriger l'hétéroscédasticité des données par une pseudo mise à l'échelle	(1)- Diminuer l'hétéroscédasticité des données, les effets multiplicatifs deviennent additifs (2)- Données avec un large écart type ou nul
<b>Transformation racine carré</b> $\tilde{x} = \sqrt{x}$		(1)- Diminuer l'hétéroscédasticité dans les données, même avec les petites valeurs (2)- Choix arbitraire

Tableau 5 : Différentes méthodes de mise à l'échelle utilisées pour le traitement chimiométrique des données, x représente les données brutes,  $\tilde{x}$  représente les données transformées et s l'écart type<sup>248</sup>

Par ailleurs, deux critères de performance sont classiquement évalués lors du calcul des modèles d'ACP ou de PLS. Le  $R^2$  évalue la part de variance expliquée par la composante au sein du modèle. Son calcul est basé sur le rapport de la part de variance expliquée par le modèle et la variance totale. Le choix du nombre de composantes doit être en relation avec le pourcentage de variance expliquée apporté par l'ajout de la composante (n+1).

Le deuxième paramètre associé au  $R^2$  est le  $Q^2$  ou capacité de prédiction. Son calcul est basé sur le rapport entre l'erreur de prédiction et la variance prédite par le modèle. En d'autres termes, il est construit sur le principe de la validation croisée. Une partie des données du set initial est utilisée pour construire un modèle et l'autre partie pour prédire les données restantes. Le choix du nombre de composantes doit se faire en rapport avec les caractéristiques du set de données (origine biologique, nombre d'échantillons notamment) mais aussi par rapport au gain obtenu en termes de  $R^2$  et  $Q^2$  obtenus par l'ajout d'une composante supplémentaire. Plus ces deux paramètres sont proches de 1 et plus le modèle est performant. De plus, il est admis que la différence observée entre  $R^2$  et  $Q^2$  ne doit pas excéder 0,3. Dans le cas contraire, le modèle est alors en sur-apprentissage. Ces deux paramètres ne sont pas les seuls à juger de la performance des modèles, mais ils sont largement utilisés quels que soient les modèles mis en œuvre (analyses multivariées, analyses discriminantes ou plans d'expériences)<sup>250</sup>.

#### **4.3.3.2 Les analyses discriminantes**

A partir des données obtenues après le prétraitement, les analyses discriminantes (DA ou discriminant analysis) permettent de prédire l'appartenance d'un échantillon à une classe. Les analyses discriminantes sont largement utilisées pour explorer les données de métabolomique.

La régression PLS est d'une manière générale utilisée pour établir des relations entre une matrice X et une réponse Y. Ce mode de calcul est très largement utilisé lors d'un étalonnage multivarié où la réponse Y est quantitative. Cependant, la réponse peut être aussi qualitative, c'est-à-dire qu'il s'agit ici d'intégrer dans la réponse Y le fait d'appartenir à une classe ou un groupe d'échantillon. Cela correspond à une analyse PLS discriminante. Le principe est de séparer la variabilité des X en deux parties (une systématique et une résiduelle). Néanmoins, une partie de la variance modélisée n'est pas forcément corrélée à la classe des échantillons et les composantes discriminantes calculées peuvent correspondre à un mélange entre la composante discriminante et non discriminante.

La correction orthogonale du signal (Orthogonal Signal Correction ou OSC) a été initialement développée pour le traitement des données spectrales. Le principe est d'utiliser la structure de la matrice Y (réponse) pour identifier dans la matrice des descripteurs X, les sources de variances qui sont orthogonales (non corrélées) à la réponse. Le filtre OSC élimine de la matrice X la part d'informations non corrélées à la matrice Y et construit ainsi une nouvelle matrice X ou Xosc. L'OPLS-DA est actuellement plus largement utilisée pour traiter les données de métabolomiques<sup>249,251-255</sup>.

L'OPLS-DA est une extension de la PLS-DA intégrant le filtre OSC. Ce mode de calcul utilise l'information contenue dans la matrice Y pour décomposer la matrice X en deux blocs. Une première partie contient l'information discriminante corrélée au Y et une autre orthogonale non corrélée. La Figure 39 illustre les différences entre PLS-DA et OPLS-DA. En effet, la PLS-DA oriente le choix des composantes en fonction des sources de variances contenues dans le set de données tandis que l'OPLS-DA choisit la première composante de façon à séparer les échantillons en fonction de leurs classes. Ainsi, l'OPLS-DA est d'interprétation plus facile que la PLS-DA.

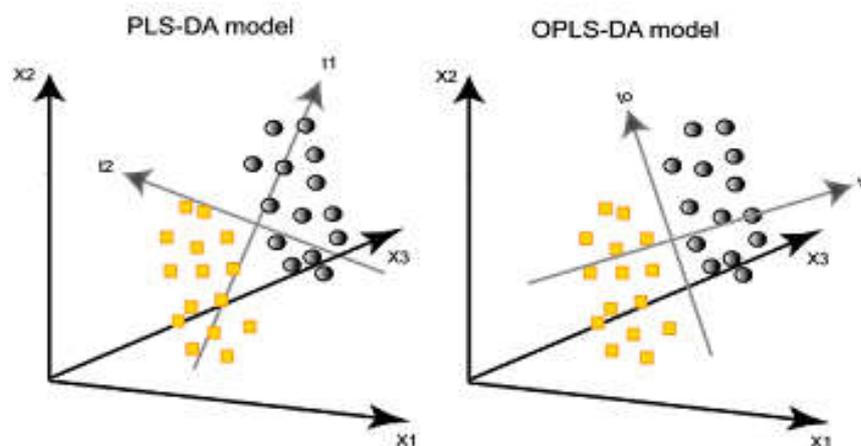


Figure 39 : Illustration de la différence entre PLS-DA et OPLS-DA<sup>251</sup>

Le S-plot permet de visualiser les variables ayant de l'influence sur la discrimination des échantillons. Cette figure combine la représentation de la covariance et de la corrélation des *loading* sur la projection de la composante discriminante. La covariance représente l'importance de la variation et la corrélation représente la reproductibilité. Ainsi, avec cet outil de présentation des variables suivant la composante discriminante, un tri des variables discriminantes ou non peut être réalisé. Leur sélection se fait de manière à choisir des groupes de variables qui présentent un maximum de variance et de covariance, autrement dit à l'extrémité de Splot<sup>251</sup> comme le représente la Figure 40.

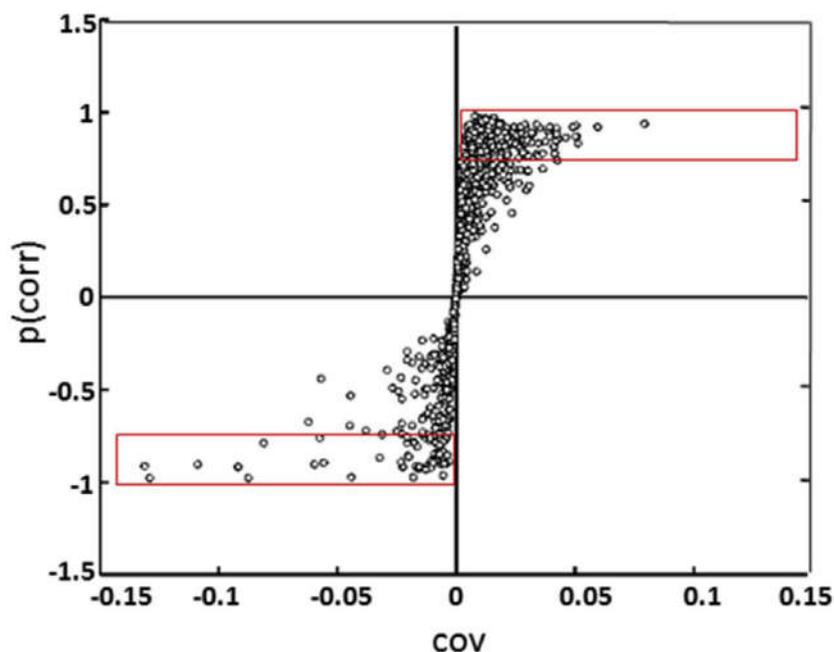


Figure 40 : Représentation S-plot d'un modèle obtenu en OPLS-DA, d'après<sup>256</sup> le cadre tracé en rouge figurant la zone où se situent les variables discriminantes

#### 4.3.3.3 Les plans d'expériences

Ils permettent de modéliser les paramètres d'un processus expérimental en minimisant le nombre d'essais réalisés. Ces paramètres peuvent être quantitatifs (débit de phase mobile, pourcentage de solvant) ou qualitatifs (présence ou non d'une agitation dans un milieu réactionnel). Pour réaliser un plan d'expériences, il faut définir les objectifs (optimisation ou analyse d'effets). Cela conditionne le choix du plan d'expériences qui correspond souvent à un compromis entre la minimisation du nombre d'expériences à réaliser et la précision ou la fiabilité des informations que l'on souhaite obtenir. Ensuite, il est nécessaire de définir les paramètres ainsi que leurs bornes, choisir la ou les réponses, enfin réaliser les expériences et valider le plan. Une régression linéaire multiple est calculée et permet d'étudier les effets principaux et selon les cas, les interactions entre les paramètres et les réponses choisies<sup>257</sup>.

Le plan d'expériences le plus connu est le plan factoriel complet. Ce type de plan permet d'étudier aussi bien les effets principaux des différents paramètres que leurs interactions. Le nombre d'essais à effectuer est de  $2^n$ ,  $n$  étant le nombre de paramètres étudiés. Le plan factoriel complet est difficilement utilisable lorsque  $n$  est élevé. Ce dernier a été largement utilisé pour optimiser des techniques de chromatographie liquide ou définir des paramètres d'ionisation en spectrométrie de

masse<sup>258,259</sup>. Il existe également d'autres plans d'expériences qui peuvent être employés comme alternative au plan factoriel complet.

#### **4.4 Identification des ions pseudo-moléculaires utilisant les données de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse**

Les analyses multivariées sont utilisées pour effectuer un tri des variables en fonction du niveau d'expression dans les différents groupes d'échantillons. L'identification des ions discriminants constitue aussi une étape importante et délicate. En effet, plusieurs approches sont possibles et il est parfois souhaitable de pouvoir utiliser différentes méthodes d'analyse pour assurer une identification des composés.

Dans un premier temps, il est possible de formuler des hypothèses concernant la classe du composé ou sa formule brute en utilisant le temps de rétention et la masse du composé ionisé. Cependant, pour un métabolite donné, il peut y avoir plusieurs molécules ionisées : adduits, ions pseudo-moléculaires ou ions fragments. Les différents adduits ou ions pseudo moléculaires peuvent présenter un intérêt car il est possible de confirmer la masse du métabolite avec plusieurs rapports m/z. En revanche, les ions fragments peuvent compliquer l'interprétation des données. L'identification des métabolites présente différents niveaux répartis en quatre catégories<sup>260</sup>.

1-**Composés inconnus** pour lesquels aucune hypothèse structurale n'est émise

2-**Composés putativement annotés** concernant les composés indisponibles commercialement mais dont l'identification repose sur une homologie spectrale ou physico-chimique reportée dans des bases de données.

3-**Composés putativement caractérisés** concernant les composés dont il n'y a pas de structure proposée dans les bases de données mais qui présentent des caractéristiques spectrales ou physico-chimiques avec des composés de la même famille.

4-**Composés identifiés** dont il est nécessaire au minimum d'avoir deux critères orthogonaux et d'avoir procédé à l'analyse d'un composé de référence dans les mêmes conditions.

Au regard de ces définitions, « identifier » un composé est particulièrement exigeant. Dans le cadre de l'analyse des lipides, on peut remarquer que les schémas de fragmentations de ces molécules sont particulièrement bien décrits dans la littérature<sup>261-263</sup> et qu'il existe un nombre important de bases de données disponibles en ligne, comme « Human metabolom database », « Metlin », « Massbank » ou « Lipidmaps ». L'identification d'un lipide pourra donc être proposée à partir du moment où il

existe une concordance entre les spectres expérimentaux et les spectres des bases de données. La diversité des lipides impose de fixer des critères d'identification, en effet pour un même rapport m/z peut correspondre plusieurs métabolites. Ces critères peuvent être basés sur les caractéristiques du système analytique. Par exemple, l'utilisation de la NP-LC permet de déterminer, la plupart du temps, la classe du lipide. Les performances du spectromètre de masse sont utilisées pour fixer les écarts tolérés entre les m/z expérimentaux et théoriques. La caractéristique de l'échantillon peut aussi exclure certaines hypothèses ; les lipides ayant des acides gras à nombre impair de carbone sont minoritaires chez les Mammifères. Enfin, pour exclure certaines structures, il est nécessaire de se focaliser sur les ions fragments les plus intenses.

Ainsi, on observe que les études lipidomiques font apparaître un grand nombre d'étapes : préparation de l'échantillon, méthodes chromatographiques, couplage à la spectrométrie de masse, traitement chimiométrique des données, identification des métabolites, hypothèses métaboliques. Certains outils disponibles en ligne, comme «XCMS on line», permettent d'effectuer automatiquement l'ensemble du traitement des données jusqu'à l'identification des métabolites discriminants en consultant la base de données «Metlin»<sup>264,265</sup>. Il peut donc être intéressant de comparer les résultats d'XCMS avec ses propres outils pour confirmer ou compléter les études. Les compétences requises pour mener à bien ces études font appel à différentes disciplines, ainsi la collaboration interdisciplinaire lors des études lipidomiques est un prérequis.



## **Chapitre 2 : Présentation du travail de thèse**

# 1 Contexte biologique de l'étude

Les maladies cardio-vasculaires représentent l'une des causes majeures de morbi-mortalité dans les pays industrialisés. Elles sont souvent caractérisées par un processus lent et insidieux : l'athérosclérose. Il s'agit d'un phénomène inflammatoire caractérisé par un dépôt sur les artères de macrophages gorgés de cholestérol, encore appelés cellules spumeuses. Un dépôt massif peut conduire à l'obstruction de la lumière des artères provoquant un accident cardio-vasculaire aigu. Comme l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie est un facteur de risque cardio-vasculaire majeur. De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la réduction du cholestérol total et du cholestérol-LDL (Low Density Lipoprotein) diminue le risque d'infarctus du myocarde. Le cholestérol-LDL est la fraction la plus athérogène du cholestérol. En excès, il tend à s'accumuler dans la paroi artérielle et à favoriser le développement de la plaque d'athérome<sup>266,267</sup>.

En revanche, les HDL (High Density Lipoprotein) plasmatiques représentent le principal accepteur du cholestérol en excès contenu dans les cellules et considéré comme l'un des facteurs principaux de protection contre les maladies cardio-vasculaires<sup>268</sup>. La sortie ou efflux du cholestérol libre des cellules est la première étape du transport inverse du cholestérol qui assure le retour du cholestérol en excès des cellules périphériques, en particulier des macrophages vers le foie, qui est le seul organe capable de l'éliminer. Actuellement, trois principales molécules membranaires sont décrites comme assurant la sortie du cholestérol libre. Parmi elles, l'ABCA1 (ATP Binding Cassette transporter A1) est le transporteur qui joue le rôle physiologique le plus important.

L'équipe de biologie « Athérosclérose : homéostasie et trafic du cholestérol des macrophages » de l'unité interdisciplinaire dans le cadre de laquelle a été réalisée ma thèse a développé des modèles cellulaires permettant d'apprécier au sein du sérum les capacités des HDL à promouvoir l'efflux du cholestérol selon ces différentes voies. Ces travaux ont ainsi permis d'établir les relations entre l'hypertriglycéridémie de sujets asymptomatiques ou l'obésité androïde de sujets normolipidiques et la composition des HDL, la présence de pré $\beta$ -HDL et l'efflux du cholestérol cellulaire<sup>269-274</sup>.

Par la suite, le versant membranaire du macrophage a été exploré. L'hypothèse de travail est que la modification de la composition en AG des PL membranaires influence l'activité de l'ABCA1 en modifiant les propriétés physico-chimiques des phospholipides. Cette modification pourrait en effet affecter l'organisation des membranes et/ou modifier leurs rôles fonctionnels comme sources d'acides gras servant de seconds messagers dans des voies de signalisation lipidique.

Cette hypothèse a tout d'abord été testée en explorant l'impact de l'incorporation membranaire d'AG de conformation *trans* sur la capacité des macrophages à céder leur cholestérol. Outre le fait que ces AG sont considérés comme impliqués dans l'augmentation du risque cardio-vasculaire, ils ont été choisis pour leurs caractéristiques structurales. En effet, l'intégration de cette catégorie d'AG présentant une double liaison en configuration *trans* rend leur chaîne carbonée aussi linéaire que celle des acides gras saturés et donc rigidifie les membranes. Les modèles cellulaires utilisés dans ce travail sont une lignée de macrophages de Souris, les J774, et des macrophages humains en culture primaire ou HMDM (Human Monocytes Derived-Macrophages). Dans ces deux modèles, l'incorporation membranaire d'acide élaïdique (C18:1 *trans* 9), AG *trans* d'origine industrielle, a pour conséquence une diminution de la capacité d'efflux de cholestérol *via* le transporteur ABCA1. L'expression et la localisation membranaire de ce transporteur ne sont pas modifiées mais l'activité ATPasique indispensable à son fonctionnement est nettement diminuée<sup>275</sup>.

Ces résultats montrent que la modification de la composition en AG des PL de la membrane peut avoir un impact sur la fonction de l'ABCA1 et ont poussé les membres de l'équipe à poursuivre ces travaux en évaluant l'impact des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI), notamment les AGPI  $\omega$ -3. Cette catégorie d'AG est reconnue pour avoir un effet bénéfique sur la prévention primaire des maladies cardio-vasculaires<sup>276-278</sup>. De plus, la présence de plusieurs doubles liaisons confère à ces AG une structure très souple pouvant donc fluidifier la membrane. Enfin, ces AG exercent sur différents types cellulaires de nombreux effets en modulant la production de seconds messagers comme les eicosanoïdes<sup>279-281</sup>. Nous avons choisi d'apprécier les conséquences de l'incorporation dans les phospholipides de la membrane des HMDM, en débutant par la famille  $\omega$ 3 avec l'acide eicosapentaénoïque (C20:5, n-3) ou EPA.

Pour ce faire, les cellules sont incubées 32 heures avec de l'EPA (70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec des cellules incubées en milieu non supplémenté en EPA (groupe témoin). Dans ces conditions, nous observons une augmentation dans les PL de l'EPA (24,5 % *versus* 1,9 %) au détriment de l'acide arachidonique (AA, C20:4 n-6) (6,6 % *versus* 15,1 %). Parallèlement à la modification de la composition membranaire, une diminution nette de 28 % de l'efflux du cholestérol ABCA1-dépendant est observée<sup>282</sup>.

Le même type d'étude a été réalisé sur des macrophages humains rendus spumeux par une surcharge en LDL acétylées (75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Les cellules sont incubées 32 heures en présence de 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  d'EPA puis 24 heures avec des LDL acétylées toujours en présence d'EPA. Les résultats du groupe EPA/LDL sont comparés à ceux obtenus avec des cellules surchargées en cholestérol mais incubées en milieux non supplémentés en EPA (groupe LDL). Dans ces conditions, nous observons une diminution importante de l'efflux du cholestérol ABCA1-dépendant de l'ordre de 34 %<sup>283</sup>. Là

encore, cette diminution n'est pas due à une modification de l'expression du transporteur. En revanche, l'impact de l'EPA sur la composition des PL membranaires est différent de celui constaté dans les HMDM non surchargés. En effet, l'augmentation de l'EPA dans les PL est plus modérée (13 % *versus* 4,7 %) pour LDL ; celle-ci se produit essentiellement au détriment de l'AA dont la proportion diminue (5,5 % *versus* 13,3 %). Cette moindre incorporation de l'EPA dans les PL n'est pas due à un défaut de pénétration de l'AG dans les cellules car on retrouve au sein des esters de cholestérol (EC), formant les gouttelettes lipidiques qui s'accumulent, une part importante d'EPA et de son produit d'élongation, l'acide docosapentaénoïque ou DPA (C22:5  $\omega$ 3) (48 %).

## 2 Contexte méthodologique et analytique de l'étude

### 2.1 Analyse lipidomique et interdisciplinarité

La diversité moléculaire des lipides est très importante comme illustré dans le chapitre précédent. De ce fait l'analyse du lipidome et l'accès à l'ensemble des données structurales des lipides représentent un véritable défi analytique. Pour y répondre, un certain nombre de méthodologies a été développé que ce soit sur le plan de la détection des lipides, leur séparation ou le traitement de l'information.

Le développement fondamental et méthodologique de l'analyse des lipides est une des thématiques de l'Unité « lipides système analytique et biologique » ou Lip(sys)<sup>2</sup> dans laquelle ce travail de thèse a été réalisé. Les techniques séparatives essentiellement chromatographiques avec l'étude des phases stationnaires et des systèmes de détection, le couplage à la spectrométrie de masse et le traitement chimiométrique des données sont les principaux axes d'étude.

Les systèmes de détection des lipides comme le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière ou DEDL<sup>284-287</sup> ou le détecteur à aérosol chargé Corona<sup>23,89</sup> (CAD) ont été particulièrement étudiés au sein de ce laboratoire. Ces détecteurs sont utilisés pour apprécier la séparation chromatographique des classes lipidiques. Le détecteur à aérosol chargé a été utilisé lors de ce travail pour effectuer la quantification des différentes classes lipidiques des extraits lipidiques de macrophages. Ce système de détection universel a été couplé à un système de séparation chromatographique à polarité de phases normale. Les supports chromatographiques utilisés dans ce mode de chromatographie liquide ont été particulièrement étudiés afin de développer des méthodes qui permettent de séparer les différentes classes phospholipidiques<sup>82</sup> ou l'ensemble des classes lipidiques<sup>288,289</sup>.

La méthode de séparation par classes lipidiques permet de proposer, en plus de la quantification des classes, une identification grâce à l'observation des temps de rétention des espèces moléculaires. En revanche, l'interprétation des spectres de fragmentation des ions pseudo-moléculaires est la seule manière d'effectuer une caractérisation. Cependant, avec cette technique, les pics chromatographiques sont larges et les coélutions nombreuses entre les espèces moléculaires d'une même classe. Ces coélutions peuvent entraîner des suppressions d'ionisation. La modification des facteurs de réponse de chaque espèce moléculaire est multifactorielle et dépend notamment du spectromètre de masse, de la sous-classe du PL, de la longueur de chaîne et des concentrations respectives de chaque espèce<sup>290,291</sup>.

Les objectifs de la thématique « lipidomique des membranes cellulaires » de l'équipe de chimie analytique sont de proposer des techniques séparatives couplées à la spectrométrie de masse et des méthodes de traitement de l'information. Cela a été initié avec la collaboration de l'unité mixte de recherche Chimiothérapie antiparasitaire dirigée par le Professeur Loiseau (l'UMR 8076 BioCIS). Le profilage LC-MS des phospholipides de souche de *Leishmania donovani* sensible ou non au traitement par l'hexadecylphosphocholine (Miltefosine) ont fait l'objet d'études lipidomiques. La comparaison statistique des profils obtenus pour plusieurs échantillons de chacune des deux populations permet de mettre en évidence les signaux caractéristiques ou les signaux sur/sous-exprimés dans chacun des deux groupes. L'accès aux bases de données ainsi que l'observation des spectres de fragmentation des phospholipides d'intérêt permettent d'identifier formellement les composés d'intérêt<sup>253,292,293</sup>. Par ailleurs, l'étude des propriétés des sources à pression atmosphérique a été réalisée afin de rationaliser leur utilisation dans le cadre des études lipidomiques<sup>180,294</sup>. Cette expertise a été l'objet de nombreuses collaborations dans des domaines variés vers l'analyse de lipides<sup>295-301</sup>.

A l'évidence, la problématique de l'analyse des lipides s'enrichit des développements méthodologiques des équipes de chimie analytique. En effet, les différentes thématiques mises en avant précédemment (méthodes chromatographiques, étude des systèmes de détection, mise au point du couplage à la spectrométrie de masse et traitement de l'information) rendent possible l'utilisation de ces techniques pour des applications pharmacologiques ou biologiques. Par ailleurs, la thématique de l'équipe de biologie précédemment exposée permettra d'appréhender le lipidome différemment et d'envisager ainsi des développements de méthodes répondant aux problématiques issues de la modification du trafic du cholestérol afin de cartographier les voies métaboliques responsables de l'athérosclérose. Le projet des équipes de chimie analytique et de biologie est de construire une entité interdisciplinaire sur les thématiques « athérosclérose » et « lipidomique des membranes cellulaires ». Cette collaboration a déjà été matérialisée par le passé notamment par la mise en relation du taux de cardioline dans les cellules et l'apoptose (mort cellulaire)<sup>302,303</sup>.

Ce travail de thèse est donc une première étape dans la création de cette interdisciplinarité offrant l'opportunité d'une approche intégrée entre chimie et biologie.

## 2.2 Aspects méthodologiques et analytiques du couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse ultra-haute résolution

La séparation des PL a été effectuée à une température de 35 °C, en utilisant une colonne PVA-Sil YMC Europe GmbH (150 mm de longueur, 2,1 mm de diamètre interne, la taille des particules est de 5 µm). Cette méthode de séparation chromatographique a été décrite dans d'autres études<sup>180,253,301,304</sup>, le programme solvant est présenté Tableau 6. Le solvant A correspond à un mélange de *n*-heptane/propan-2-ol (98:2 ; v/v), le solvant B correspond à un mélange chloroforme/propan-2-ol (65:35 ; v/v) et le solvant C est un mélange de méthanol et d'eau (95:5 ; v/v). Dans toutes les phases mobiles, 1 % d'acide acétique et 0,08 % de triéthylamine sont ajoutés pour optimiser l'ionisation des lipides dans la source et la séparation des lipides.

Temps (Min.)	A: <i>n</i> -Heptane/Isopropanol (98 :2 ; v/v)	B: Chloroforme/Isopropanol (65 :35 ; v/v)	C: Méthanol/Eau (95 :5 ; v/v)
0	98	2	0
3	12	88	0
16	0	60	40
17	98	2	0
30	98	2	0

Tableau 6 : Gradient linéaire utilisé pour la séparation chromatographique des phospholipides

Cette méthode chromatographique a été couplée à deux systèmes de détection. Le premier a servi lors du chapitre 3 pour établir les profils phospholipidiques Full-Scan des macrophages J774 enrichis ou non en AG ω3. L'objectif est ici d'effectuer un criblage de la composition des phospholipides entre les deux groupes d'échantillons et de déterminer si les groupes peuvent se distinguer par leur composition. Lors de cette étude, le système chromatographique est composé d'une pompe 4 voies et d'un injecteur automatique (Hewlett-Packard 1050, Böblingen, Allemagne). Le débit est de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> et le volume d'injection de 10 µL. Dans cette étude, nous avons utilisé un analyseur de masse triple quadripolaire API 3000 (ABSciex<sup>®</sup>, Allemagne) équipé d'une source ESI et piloté par le logiciel Analyst<sup>®</sup>. La résolution est de 2000. Les solvants et analytes se retrouvent dans un capillaire d'ionisation réglé à 4000 V à une température de 280 °C en ionisation négative. La pression

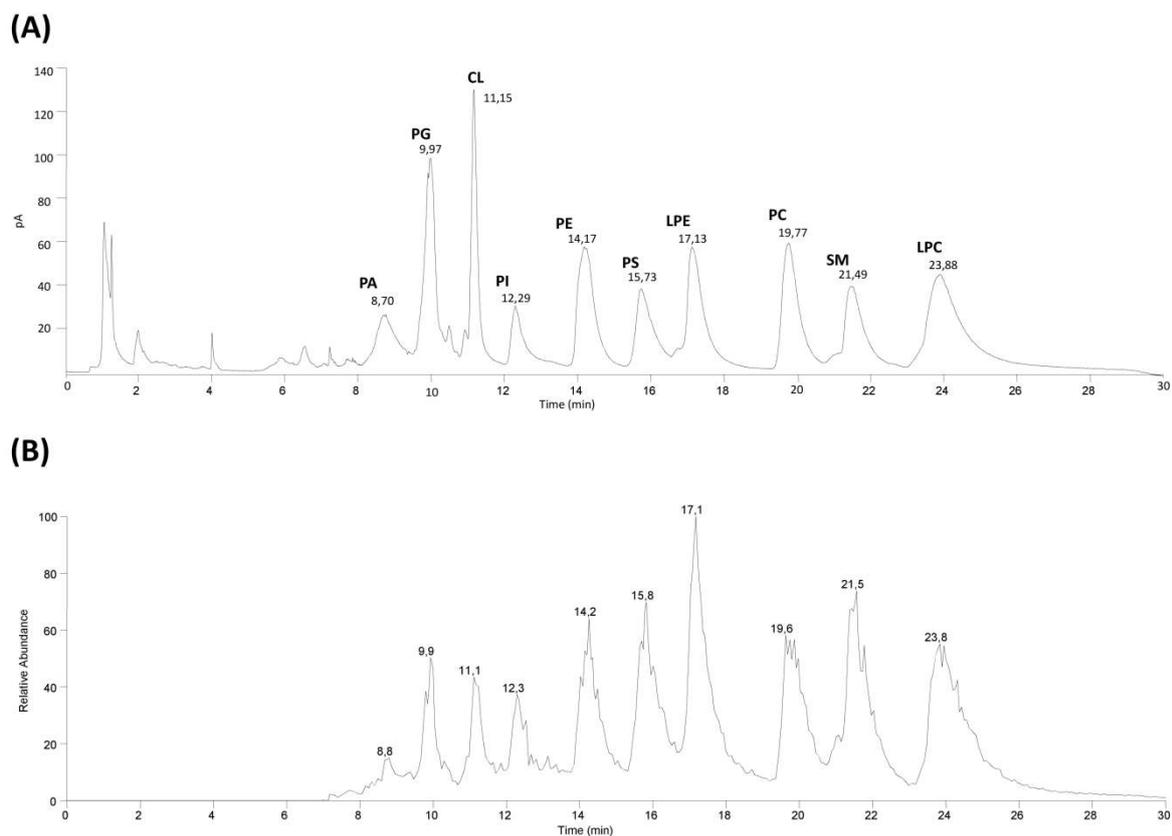
du gaz rideau et de nébulisation ainsi que les potentiels d'entrée, de déclusterisation et focalisation sont indiqués dans le Tableau 7.

	Valeur des paramètres en ionisation négative
Pression du gaz rideau	7
Pression du gaz nébulisation	9
Potentiel d'entrée	± 10
Potentiel de déclusterisation	± 40
Potentiel de focalisation	± 400

**Tableau 7 : Paramètres utilisés sur l'API 3000 lors des études Full-Scan (unité arbitraire)**

Les résultats obtenus ont suggéré d'une part, que l'apport d'AG  $\omega$ 3 dans des cultures de macrophages modifiait de façon significative les profils phospholipidiques et, d'autre part, que l'utilisation de la spectrométrie de masse basse résolution n'était pas adaptée. En effet, le traitement des données de basse résolution impose de considérer les deux types d'ionisation (positive et négative) et de différer dans le temps les expériences MS/MS afin d'identifier les métabolites discriminants. Par ailleurs, l'identification en ionisation négative des phosphatidylcholines nécessite une MS<sup>3</sup> du précurseur déméthylé qui n'est pas possible avec un triple quadripôle. Enfin, des expériences préliminaires de profilage phospholipidique de macrophages humains ont montré que la quantité d'échantillon recueillie ne permet pas d'identifier tous les métabolites discriminants.

Ainsi, le second système couplé à la méthode de chromatographie liquide permettant la séparation des différentes classes phospholipidiques est constitué d'une double détection. Le débit des effluents chromatographiques a été réduit à 0,25 mL.min<sup>-1</sup> au détecteur Corona (Thermo-Fischer Scientific) pour les analyses quantitatives. De l'éthanol a été mélangé aux effluents chromatographiques à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> fourni par une seconde pompe chromatographique. Un débit de 0,15 mL.min<sup>-1</sup> est envoyé vers un spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap Velos Pro (ThermoFischer Scientific) équipé d'une source Electrospray. Les chromatogrammes d'un mélange de standards sont représentés Figure 41, en détection Corona et en courant ionique total.



**Figure 41 : Analyse d'un mélange de standards de phospholipide détecté par Corona (A) et spectrométrie de masse (B)**

Cet équipement est disponible au sein du service d'analyse des médicaments et métabolites (SAMM), plate-forme de spectrométrie de masse qui fait partie de l'Institut Paris Saclay d'Innovation Thérapeutique (IPSIT). Profitant des acquis méthodologiques de l'équipe de chimie analytique ce service est intégré au sein d'un projet de développement d'une plate-forme d'analyse lipidomique. L'utilisation d'un système UHPLC bidimensionnel couplé à la spectrométrie de masse ultra-haute résolution offre la possibilité de réaliser des études sur un matériel de haut niveau. Ce service dispose aussi d'un encadrement technique et scientifique.

L'observation des chromatogrammes présentés Figure 41 montre que les différentes classes phospholipidiques sont séparées selon une fenêtre d'élution. En effet, les différents pics chromatographiques sont larges et présentent une plage d'élution comprise entre 1 et 2 minutes. Ainsi, il existe de nombreuses coélutions entre les espèces moléculaires appartenant à une même classe. Ce système chromatographique offre la possibilité de proposer une première identification en se référant au temps de rétention. Les six premières minutes du chromatogramme correspondent à une zone d'élution d'autres composés que les phospholipides (lipides neutres, cholestérol). Lors de ce travail de thèse ces classes lipidiques n'ont pas été étudiées. De plus, l'utilisation exclusive de la source Electrospray ne permet pas leur ionisation.

Le couplage de la méthode de séparation des PL avec le spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap™ nécessite l'optimisation de certains paramètres caractéristiques qui sont détaillés ci-après. L'objectif de ce couplage est de permettre l'analyse et l'identification d'un grand nombre de phospholipides afin de réaliser des analyses chimiométriques des données Full-Scan, les ions discriminants étant identifiés au moyen des données disponibles de fragmentation.

L'analyseur Orbitrap™ est utilisé pour effectuer le balayage Full-Scan des ions tandis que la fragmentation est réalisée par le système de double trappe linéaire à basse résolution. La détection de l'ion moléculaire en ultra-haute résolution est effectivement nécessaire puisque la précision du rapport  $m/z$  est un prérequis pour effectuer l'identification de chaque ion. En effet, les phospholipides sont des composés présentant une diversité structurale importante. Il est donc commun de rencontrer pour une même valeur de rapport  $m/z$  plusieurs métabolites correspondants. La détection en ultra-haute résolution permet de limiter le nombre de possibilités en se basant sur l'hypothèse que le rapport  $m/z$  de l'ion moléculaire est détecté avec une précision minimale de deux chiffres derrière la virgule. Lors de la consultation des bases de données en ligne ce critère de précision de l'ion moléculaire est fondamental. La fragmentation est, quant à elle, effectuée à basse résolution. En effet, le schéma de fragmentation des phospholipides est quelque chose de très bien décrit par la littérature<sup>261,263</sup>. Si l'ensemble des fragments caractéristiques d'une espèce moléculaire est observé, une résolution unitaire pour chaque fragment est suffisante. La détection en ultra-haute résolution pour les ions fragments est effectuée lorsque les classes lipidiques fournissent un spectre de fragmentation avec peu d'ions, comme par exemple les céramides ou les dérivés d'hexosylcéramide.

Le balayage Full-Scan des ions moléculaires a été effectué dans une gamme de rapport  $m/z$  comprise entre 300 et 1800. Ce domaine correspond au rapport  $m/z$  rencontré au cours d'analyse phospholipidique. En effet, les PL possédant le rapport  $m/z$  le plus faible sont les classes LPE et LPC qui est compris, selon la base de données LipidMaps, entre  $m/z$  350 et 600. La limitation de la gamme de masse analysée dans le cadre de l'analyse des phospholipides est donc adaptée.

Deux paramètres sont importants à renseigner pour paramétrer les acquisitions de spectrométrie de masse en tandem. Le premier est le seuil de déclenchement de la sélection des précurseurs. Idéalement le meilleur moment pour fragmenter une espèce correspond à l'apex du pic d'élution chromatographique. Ce moment est dit « idéal » puisque l'on peut supposer que c'est au moment où l'espèce moléculaire est la plus intense que le spectre de fragmentation présente le meilleur rapport signal/bruit. Le deuxième paramètre correspond à la durée de l'exclusion dynamique. Ce paramètre correspond à la durée pendant laquelle un précurseur déjà fragmenté ne doit pas être sélectionné. La valeur de cette durée ne doit pas être trop courte puisqu'un même ion risque d'être

fragmenté plusieurs fois sans apporter aux données des informations supplémentaires et ne doit pas être trop longue pour qu'un ion isobare d'un précurseur de la liste d'exclusion ne risque pas d'être sélectionné alors qu'il ne s'agit pas de la même espèce lipidique.

Ainsi lors des différentes acquisitions, le mode d'ionisation négative a été exclusivement utilisé pour obtenir des informations structurales sur les espèces moléculaires. La fragmentation CID (collision induced dissociation) est réalisée sur le top 5 des ions les plus intenses détectés lors de l'acquisition Full-Scan. Le seuil d'intensité est fixé à  $1,0E+05$ . Ce seuil ne peut pas être fixé en calculant la dérivée (sommet des pics) des pics chromatographiques. En effet, les différentes classes phospholipidiques sont séparées suivant des fenêtres d'élution de l'ordre de la minute. Ce seuil a donc été fixé en observant l'intensité des ions constituant un pic. L'objectif est d'établir des profils phospholipidiques permettant d'identifier le maximum d'espèces moléculaires. Pour la  $MS^3$  ce sont les deux ions les plus intenses, observés lors du spectre  $MS^2$ , qui sont fragmentés. Le seuil d'intensité est ici fixé à 500. La fragmentation du top 5 se fait 3 fois pour chaque ion sur une plage de 30 secondes, ils sont ensuite ignorés pendant 15 secondes pour s'intéresser au top 5 suivant. Ce mode d'acquisition est particulièrement intéressant pour effectuer un grand nombre de fragmentations et ainsi pouvoir déterminer la structure d'un maximum de PL.

### **2.3 Aspect méthodologique de l'identification des composés lipidiques**

Pour les acquisitions à basse résolution, les ions identifiés correspondent aux espèces qui sont les plus discriminantes pour chacun des groupes. De plus, seule l'ionisation négative a été étudiée : ainsi les ions correspondant au PC n'ont pas été considérés lors du chapitre 3. Pour identifier les espèces moléculaires, les spectres obtenus en spectrométrie de masse en tandem ont été comparés aux spectres existant dans les bases de données LipidMaps et MassBank, après avoir effectué des hypothèses de structure.

Avec le spectromètre de masse ultra-haute résolution plusieurs critères ont été pris en compte. Ainsi, les  $m/z$  des ions pseudo-moléculaires ont été sélectionnés de manière à minimiser la différence entre le  $m/z$  expérimental et le  $m/z$  théorique. En effet, l'utilisation d'un analyseur Orbitrap™ permet d'exiger des écarts entre les  $m/z$  inférieurs à 0,5 unité de masse. Autant les tolérances apportées sur l'ion moléculaire sont strictes autant les tolérances apportées aux ions fragments sont larges en raison de la détection basse résolution de la double trappe linéaire (inférieure à une unité de masse).

De plus, les différents PL sont considérés comme étant « identifiés » lorsque l'ensemble du schéma de fragmentation proposé dans les bases de données est retrouvé expérimentalement. Cette

« identification » est réalisée selon deux critères orthogonaux qui sont caractérisés par le temps de rétention (définition de la classe lipidique) et le spectre de fragmentation. La fragmentation des PL peut fournir un spectre d'une dizaine d'ions fragments pour les éthers de PE, jusqu'à une vingtaine pour les PI. On distingue les fragments caractéristiques de la classe phospholipidique et ceux renseignant sur la nature des AG. De plus, l'observation de l'intensité des ions peut être utilisée pour sélectionner certains métabolites en fonction du rapport signal/bruit du spectre de fragmentation. Lors de ce travail, les 20 ions les plus intenses des spectres MS<sup>2</sup>/MS<sup>3</sup> ont été considérés afin d'identifier les PL. Par ailleurs, l'observation des intensités des différents fragments lyso permet de définir la position des acides gras (*sn1* ou *sn2*). Néanmoins, pour prétendre à ce qu'un composé soit identifié selon la nomenclature, il est nécessaire de réaliser une analyse d'un composé référence. Cette analyse n'a pas été effectuée, non seulement à cause de la diversité des métabolites analysés au cours cette thèse, mais aussi à cause de l'indisponibilité de certains composés références et du temps analytique nécessaire.

Lors du chapitre 4, l'identification des cardiolipines (CL) s'est effectuée en deux étapes. Une première analyse a permis de déterminer les ions constitutifs correspondant aux CL. Le mode d'acquisition des données présentées dans le paragraphe précédent ne permet pas d'identifier tous les composés. En effet, la fragmentation MS<sup>2</sup> produit deux acides phosphatidiques. En cas de coélution il n'est donc pas possible pour l'analyseur de fragmenter tous les ions. Ainsi, chaque échantillon a été analysé de façon à ne cibler que les ions de CL nécessitant une identification.

Les PL sont écrits comme suit : PL (18:0/18:2) quand les positions *sn1* et *sn2* des chaînes d'AG sont connues ou séparées notés CL (16:0/16:0\_16:1/16:1) « \_ » indique que la position n'est pas connue.

Parfois l'utilisation des bases de données de Lipid Maps n'ont pas permis de déterminer la nature des ions observés. L'utilisation d'autres sources comme Human Metabolom Database (HMDB) ou METLIN ont été consultées afin de déterminer la nature des composés. La précision donnée par l'analyseur Orbitrap<sup>TM</sup> sur les ions moléculaires est dans ce cas précieuse. Le croisement des données de la littérature ont permis d'identifier des composés comme les gangliosides, les hexosylcéramides ou les sphingolipides.

Ces résultats ont servi de socle à mes travaux de thèse. En effet, l'équipe de biologistes a exploré les mécanismes induits par l'addition d'EPA à l'origine de la diminution de l'efflux du cholestérol des HMDM surchargés ou non, tandis que l'équipe de chimie analytique a développé les outils méthodologiques pour effectuer un profilage des phospholipides. Parallèlement, je me suis attaché à développer certains outils analytiques présentés dans le chapitre 1 couplés à une démarche

rationnelle de traitement des données chimiques afin d'identifier les espèces moléculaires discriminantes pouvant être associées à la diminution d'efflux. Préalablement à l'acquisition de ces analyses lipidomiques, des étapes de mise au point se sont révélées nécessaires afin de mieux maîtriser les aspects multidimensionnels des données obtenues. Ainsi, mes travaux s'articulent autour de quatre axes de recherche présentés ci-dessous.

### **3 Etude de l'impact du prétraitement sur les résultats des analyses discriminantes**

Ce travail a été réalisé à l'aide de macrophages de Souris J774 dont la culture est aisée et qui offrent l'avantage de fournir une grande quantité de matériel cellulaire dans un temps très court. L'objectif est de réaliser une étude non ciblée d'extraits lipidiques de macrophages cultivés en présence d'EPA 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou non. L'étude a été menée en utilisant une technique de séparation chromatographique à polarité de phase normale pour séparer les différentes classes de phospholipides couplée à un spectromètre de masse basse résolution (triple quadripôle).

Préalablement à l'analyse discriminante des données, une étude sur le prétraitement des données LC-MS a été effectuée en utilisant le logiciel Mzmine sur les données biologiques obtenues. Ce traitement des données présente plusieurs étapes comprenant chacune plusieurs paramètres. Ainsi, un plan d'expériences a été construit pour évaluer l'influence du niveau de chaque paramètre sur le nombre de variables obtenues en fin de prétraitement et sur la qualité des modèles chimiométriques obtenus.

### **4 Etude lipidomique descriptive de différents types de macrophages**

Les macrophages en culture recouvrent une grande hétérogénéité de types cellulaires pouvant répondre de façon très différente à un stimulus. Si la principale différence réside dans l'origine des cellules (murines ou humaines), l'utilisation de macrophages en primoculture *versus* une lignée transformée peut être plus pertinente. Dans ce cadre, une étude lipidomique de trois types de macrophages (J774, lignée de monocytes-macrophages humains THP1 et HMDM) a été réalisée pour objectiver les différences de compositions qui peuvent exister. De plus, une identification de l'ensemble des espèces lipidiques contenues dans ces échantillons a été effectuée pour montrer les similitudes entre ces trois modèles.

## **5 Etude de l'impact de l'incorporation d'acide gras $\omega$ 3 sur les phospholipides de macrophages humains et mise en relation avec la diminution d'efflux du cholestérol**

L'incorporation d'EPA dans les HMDM s'accompagne d'une diminution de l'efflux ABCA1-dépendant associée à de profondes modifications de la composition membranaire<sup>282</sup>. La composition en AG des PL a été obtenue par une technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) mais, avec cette technique, il est impossible de savoir sur quelles classes de lipides l'acide gras est incorporé. Or, le fonctionnement de l'ABCA1 peut être influencé par la composition fine des PL membranaires, notamment la teneur en PS<sup>305</sup>. Aussi, l'utilisation des techniques de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse m'a permis d'étudier la distribution des différentes classes de PL et les variations de leurs espèces moléculaires. Ce travail a été mené à l'aide de 11 poches de sang et deux groupes de macrophages ont été constitués : des HMDM supplémentés en EPA et des HMDM non supplémentés en EPA (témoins). La comparaison des profils lipidiques obtenus a conduit à la caractérisation d'espèces lipidiques discriminantes en partie responsables des variations d'efflux observées.

## **6 Etude de l'impact de l'incorporation d'acide gras $\omega$ 3 sur les phospholipides de macrophages humains spumeux et identification des mécanismes biochimiques de la diminution d'efflux du cholestérol**

L'incorporation d'EPA dans les macrophages humains spumeux s'accompagne également d'une diminution de l'efflux du cholestérol, notamment d'une moindre activité ABCA1-dépendante<sup>283</sup>. Dans ce modèle, l'impact de l'EPA sur la composition des PL membranaires est différent de celui constaté dans les HMDM non surchargés. Surtout, les mécanismes biologiques à l'origine de la réduction de l'efflux ne sont pas du tout les mêmes. A l'aide de 7 poches de sang, j'ai donc réalisé une approche lipidomique en comparant les profils lipidiques des HMDM surchargés en cholestérol et supplémentés en EPA (groupe EPA/LDL) à celui des HMDM surchargés en cholestérol (groupe LDL). Si un certain nombre de différences observées précédemment subsiste, aucune espèce moléculaire n'a pu être reliée aux variations d'efflux. La Figure 42 et Figure 43 présente l'ensemble des travaux réalisés.

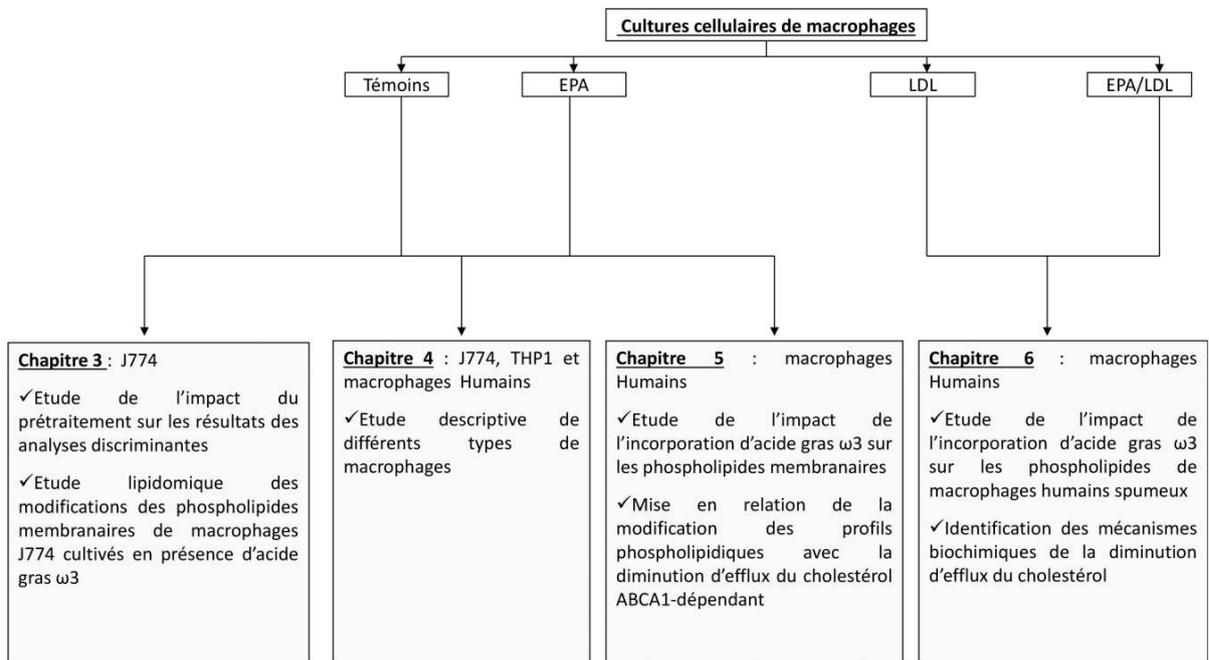


Figure 42 : Différentes parties du travail de thèse

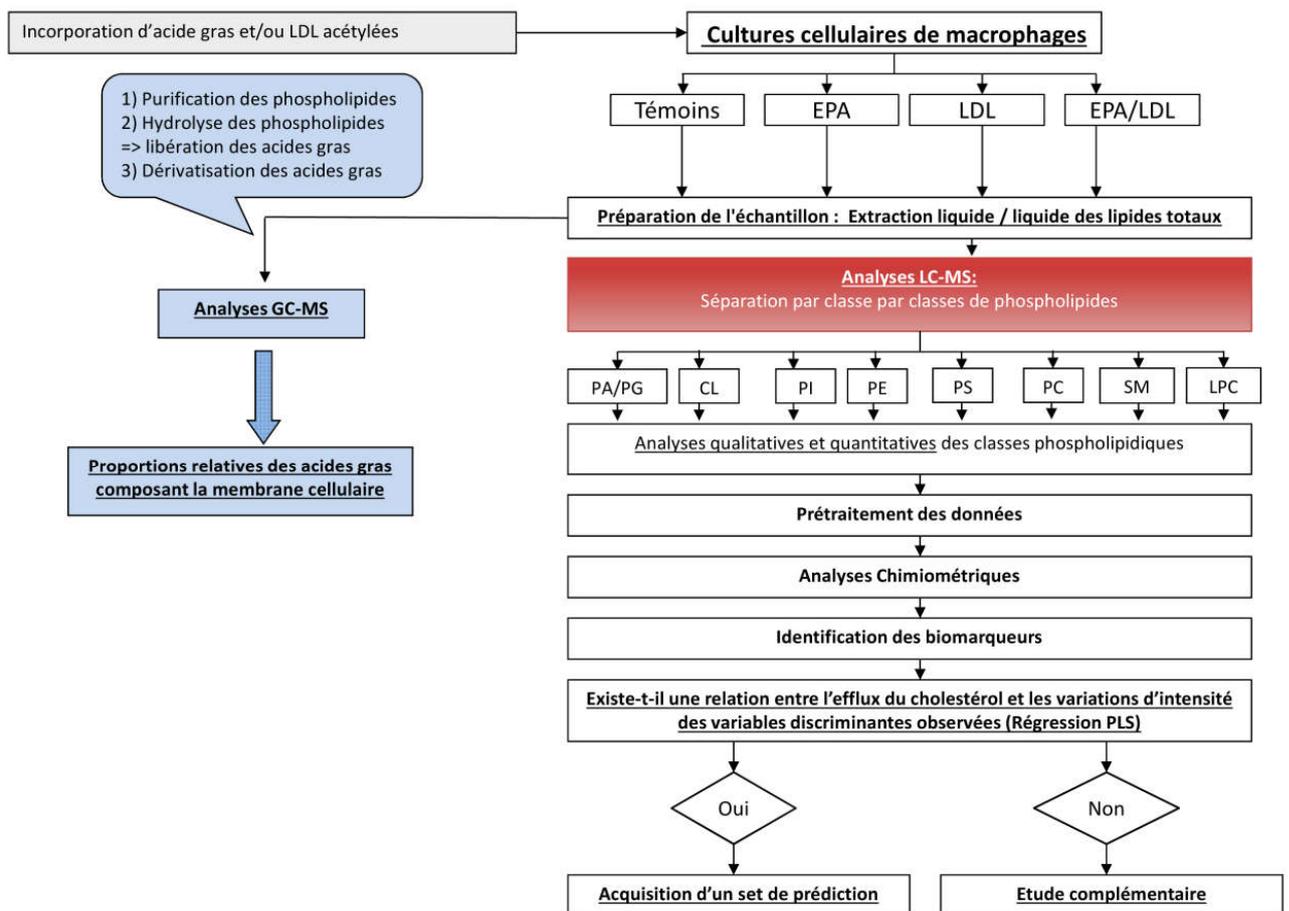


Figure 43 : Stratégie analytique adoptée

# **Chapitre 3 : Etude de l'impact du prétraitement sur les résultats des analyses discriminantes**

# A study of the influence of Mzmine pretreatment parameter using a Plackett-Burmann design in the framework of J774 macrophages phospholipidomics

## Authors

Guillaume Sayet<sup>1</sup>, Eric Caudron<sup>1,3</sup>, Sana Tfaily<sup>1</sup>, Natalie Fournier<sup>2,4</sup>, Jean-Louis Paul<sup>2,4</sup>, Pierre Chaminade<sup>1</sup>

1: EA7357, Lip(Sys)<sup>2</sup>, Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France

2: EA7357, Lip(Sys)<sup>2</sup>, Athérosclérose : homéostasie et trafic du cholestérol des macrophages (FKA EA4529), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France

3: AP-HP (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), Hôpital européen Georges Pompidou, Service de Pharmacie, 75015 Paris, France

4: AP-HP (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), Hôpital européen Georges Pompidou, Service de Biochimie, 75015 Paris, France

Corresponding Author: Pierre Chaminade

Email: pierre.chaminade@u-psud.fr

Address: UFR Pharmacie, Université Paris-sud, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

Tel: +33146835490 Fax: +33149835458

## Abstract

Lipidomics provides information at the molecular species level and represents a growing field compared to other omics. Methodological developments in liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) separation/analysis techniques coupled with data processing were the keys for these improvements. Multivariate analyses and chemometric tools enabled to understand and manage the huge volume of generated data. Data processing consists of many steps. One critical step is the preprocessing or pretreatment as it generates the data matrix on which the statistical models will be applied.

Using a Plackett-Burman experimental design, we decided to study the weight of MZmine 2 software pretreatment parameters (peak detection, alignment and gap filling). LC-MS data were generated from biological samples, i.e. the J774 macrophage cell line in two different culture media. This work was intended to assess the impact of  $\omega 3$  fatty acids on the phospholipids of J774 murine macrophage membranes. Lipidomic data were obtained by normal-phase high performance liquid chromatography and analyzed with a triple quadrupole LC-MS mass spectrometer in full scan mode.

After data pretreatment, an orthogonal signal correction-partial least squares-discriminant analysis (OSCPLS-DA) was applied. The dimensions of pretreated matrices were compared and the number of discriminant variables obtained from OSCPLS-DA results was evaluated.

Results showed that the dimensions of the pretreated matrix decreased when the chromatogram builder and deconvolution parameters increased. Normalizing by average intensity after deconvolution can decrease the variables count.

## Keywords

Experimental design, lipidomics, liquid chromatography, mass spectrometry, pretreatment, J774 macrophages

## Highlights

- An experimental design was processed on LC-MS pretreatment parameters using biological data
- Variables counts are tightly influenced by chromatogram builder and deconvolution step
- Discriminant and species count are influenced by data set, normalization and some parameters in chromatogram builder
- Defining pretreatment parameters is tightly related to the characteristics of the instrument of measurement
- Lipidomic profiles of J774 macrophages were analyzed and highlight significance of glycerophosphatidylinositol molecular species

# 1 Introduction

The purpose of metabolomics is to characterize molecules in biological systems with a complexity ranging from an entire organism to a single cell. Metabolomics represents the endpoint of the "omics" cascade and is the closest point to phenotypes. Molecular species, primarily nucleic acids, amino acids, and lipids, can vary in space and time [1–3].

Lipidomics is a branch of metabolomics involving the complete characterization of lipids in a biological system with the goal of understanding cell signaling, membrane architecture, transcriptional modulation and responses to environmental changes [4, 5]. The variety of lipid structures covers a broad polarity domain [6, 7]. In section 1 we described the nomenclature of lipids.

## 1.1 Nomenclature of lipids

Basically lipids are defined as organic compound soluble in organic solvent. Recently, the Lipid Maps initiative established a modern classification. This classification is based on ketoacyls and isoprene groups. Lipids are organized into eight categories, which are divided into classes and subclasses. Nomenclature follows the International Union of Pure and Applied Chemists and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUPAC-IUBMB) recommendations (defined abbreviations, stereospecific numbering or double bound geometry). LIPID MAPS Identifier lists about 40 000 lipid structures [6–9].

Several analytical tools have been used for lipid analysis, among which chromatography is one of the most widely applied [10]. Gas chromatography coupled with mass spectrometry detection (GC-MS) is routinely used to investigate fatty acid metabolism. This technique requires sample preparation that currently includes pre-separation of the different lipid classes using solid phase extraction, high performance liquid chromatography or thin layer chromatography, due to the complexity of the biological samples. Furthermore, *trans*-esterification is usually carried out in order to increase volatility of the compounds by forming fatty acid methyl esters (FAME). The main drawback of GC is that compounds analyzed must be heat stable so they can be volatilized during injection without degradation [11, 12]. This approach therefore restricts analyses in GC to a certain class of lipids, in contrast with high performance liquid chromatography (HPLC).

High performance liquid chromatography techniques are widely used and can be classified according to the nature and the polarity of the stationary phase. Normal-phase chromatography

separates lipid classes depending on different polar heads [13–18], while reverse-phase separation depends on fatty acid groups (hydrophobicity) and leads to the separation of molecular species within a given lipid class [19–21]. Furthermore, the development of two-dimensional chromatographic systems assembling the two retention properties orthogonally (2D-HPLC) *i.e.* reverse-phase chromatography and hydrophilic interaction chromatography (HILIC), has improved the capacities to separate compounds [22, 23]. In section 2 an overall of advances in lipidomic studies is presented.

## 1.2 Lipidomic studies, features for structural molecular identification

For lipidomic studies, HPLC coupled with mass spectrometry (MS) can be configured with a variety of implementations (different ionization sources and mass analyzers). Electrospray ionization is in fact characterized by a low production of fragment ions and is particularly suited for the analysis of intermediate polar compounds with high molecular weights. This source is therefore well suited for the analysis of phospholipids, the major components of cell membranes [24, 25]. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and atmospheric pressure photoionization (APPI) are better suited for less polar or neutral lipids [26]. Advances in mass analyzers have improved mass resolving power, measurement accuracy and have provided the possibility of MS<sup>n</sup> records, in particular with a Fourier transform mass analyzer (Orbitrap and ion cyclotron resonance) [27]. LC-MS technologies can be used for a holistic approach and for focused lipidomic strategies [28, 29]. The magnitude of generated data is considerable, especially in the case of non-targeted analyses, explaining why extracting and interpreting relevant information from large datasets requires statistical analysis. Non targeted lipidomics allow to reveal the importance of a specific lipid molecular specie and/or to highlight the activity of some biomarkers. Lipidomic approaches became attractive and require an accurate identification of the significant lipid species. Fortunately, LC/MS platforms allow to cope with sample complexity but often generate multiple features (*i.e.*; adduct ions) for a given compound. The latter might be present in the sample with different structures (chirality or isomerism). Therefore, the associated use of RT, *m/z* value, fragmentation pattern is essential to propose identification. Databases such as Human Metabolome DataBase (HMDB) and LIPID MAPS help in identifying the compatible structures but are still incomplete if reported to the entire lipidome. An analytical comparison using an authentic standard remains the accurate way to achieve confident identification of a specific compound [30]. Signal optimization or chromatographic performance is a critical step in LC-MS techniques. A large number of parameters are adjustable and it can be very time consuming to find an optimum.

### 1.3 DoEs role in HPLC, software, and mass spectrometry

Conventionally, optimizing response consists of changing parameters one at a time. This approach is too long and do not consider the interaction between factors. Design of experiments (DoE) is a methodological approach based on a matricization of the experimental domain. It allows for choosing levels and combinations of experimental parameters for a controlled response. The advantages are to study large number of factors with the minimum of experiments. DoEs are usually used in LC-MS analyses to screen or optimize analytical signal [31, 32] but DoEs can also be used in LC-MS data processing and this is the main object of the present paper.

Data processing applied to LC-MS is conventionally divided in two steps: data pre-processing and data analysis. LC-MS data files can be visualized as a 3D structure according to the axes of  $m/z$  values, retention times and intensities. Pretreatment involves transforming raw data files into a data matrix [33–35]. Different software applications have been developed to automate pretreatment. Some are commercially available (MarkerLynx), and others are available in open source access (XCMS, MZmine2, MetAlign). It is also possible to develop personal scripts using a digital computing and programming language (Matlab, R) [36]. These tools offer the possibility of conducting the three basic steps of LC-MS data pre-treatment, *i.e.* peak detection, alignment and gap filling [37].

The first step, peak detection, creates a defined list of peaks based on masses and retention times. Intensity is associated with each retention time-mass couple. Intensity is represented by peak height or area. The second step is alignment, required to compare different metabolites between samples. The purpose is to align retention times and masses by correcting differences for the same molecular species in all samples. After LC-MS analysis, there may be missing data from undetected peaks, for example in the case of less intense responses. Missing data can evidently lead to inaccurate statistical interpretation: the third pretreatment step is therefore gap filling, which helps in estimating heights and areas for missed peaks. Data analysis is conducted after these pretreatment steps.

Among applicable statistical analyses, principal component analysis (PCA) and clustering methods are widely used. These methods identify molecular species that may be expressed differently in different groups.

As mentioned, data pretreatment is a crucial step in LC-MS data processing. The pretreatment matrix depends on the preprocessing method: different peaks can be extracted from the same dataset [38]. Preprocessing parameters must be selected in accordance with experimental conditions. In most preprocessing software, visual tools are available to evaluate pretreatment parameters, but the

assessment of pre-processing quality remains difficult and subjective. A DoE methodology can be conducted on pretreatment parameters to analyze which factors are significant.

In this study, pretreatment parameters of Mzmine2 were defined using design of experiments (DoE). The contribution of each factor and how it influences the number of variables retained were determined. This method was applied to dataset issued from a biological model: J774 macrophage cell line cultured with an  $\omega$ 3 fatty acid.

## 1.4 Biological impact of PUFA

Macrophages play key roles in both early atherogenesis and advanced plaque progression. The accumulation of cholesterol-loaded macrophages in the arterial wall is the hallmark of the early atherosclerotic lesion [39]. Efflux of cholesterol from macrophages is a cardioprotective mechanism, whose importance is emphasized *in vivo* mouse models [40] as well as in clinical studies in humans [41]. The murine cell line J774 is a widely used model providing accurate and reproducible cholesterol efflux data [42]. Moreover, it was reported that the efflux capacity of human serum measured using J774 cells is a reflection of its ability to reduce cholesterol from vessel wall cells, as measured by intima media thickness and angiography [43]. To date, it is believed that the transporter ABCA1 is the most important mechanism to egress cellular cholesterol [44]. This full membrane transporter is highly sensitive to modifications in membrane physicochemical properties [45]. It is extensively reported that PUFA incorporation into membranes may alter the fluidity, organization and function of membrane proteins. These effects are mainly attributed to the induced changes in FA composition of membrane phospholipids. For example, we previously reported that transelaidic FA reduced the ABCA1-mediated cholesterol efflux from J774 cells likely by decreasing membrane fluidity [46]. More recently, we showed that EPA membrane incorporation affects the fatty acid composition of PL and reduces ABCA1 functionality in mouse macrophages as well as in primary human macrophages through a protein kinase A (PKA)-dependent mechanism [47]. Thus, it appeared that the development of highly precise and reproducible analytical tools is necessary to identify the potential modifications of molecular PL species.

In the present paper, data were obtained from normal-phase HPLC (NP-HPLC) coupled with a triple quadrupole mass spectrometer in negative full scan mode; the analysis focused on phospholipids. There is growing evidence that a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) is cardioprotective [48, 49]. The molecular mechanisms underlying this effect are not completely elucidated but PUFA incorporation into membranes may affect the fluidity, organization, function of membrane proteins and could also modify the molecular species of PL. In this context, a lipidomic

profiling of PL macrophages incubated with PUFA in order to identify the potential alterations of PL species appears to us of interest.

## **2 Materials et methods**

### **2.1 Cheminals**

#### **2.1.1 Standards**

The phospholipid standards used for LC-MS analyses were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France): diphosphatidylglycerol or cardiolipin (CL), glycerophosphatidylinositol (PI) (extracted from bovine liver), L- $\alpha$ -glycerophosphatidylethanolamine (PE), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC), L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine (LPC) (extracted from egg yolk), L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-serine (PS) and sphingomyelin (SM) (extracted from bovine brain). Standards were run in each assay at 0.5 g.L<sup>-1</sup> prepared in chloroform/methanol (2/1, v/v). All analytes were stored at -20°C before analyses.

#### **2.1.2 Solvents**

The solvents used for extractions and chromatographic analyses were *n*-heptane, 2-propanol, chloroform and methanol. All solvents were HPLC-grade, obtained from VWR International (Strasbourg, France). 99% triethylamine and glacial acetic acid were analytical grade reagents purchased from Sigma Aldrich.

## **2.2 J774 murine macrophage culture and extraction of phospholipids**

J774 murine macrophages were seeded in 6-well plates (250,000 cells/well) in complete medium (RPMI 1640 supplemented with glutamine, penicillin-streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum). Cells were incubated at 37°C and in an atmosphere of 5% of CO<sub>2</sub> until they reached 80-90% confluence. Then, cells were supplemented with 70  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> of eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3 or EPA) for 34 h (EPA group) or not treated (NT group).

The method for extracting lipids was adapted from that of Folch *et al.* [50]. Plate wells containing cells were washed twice with 2 mL of phosphate buffered solution (PBS) and then with 1

mL of ultra-pure water. The cell suspensions were then mixed with 4 mL of chloroform/methanol (2/1, v/v).

Samples were mixed twice with a vortex mixer for 30 seconds, stored at 4°C for at least one hour and then centrifuged at 3000 g for 5 minutes. The lower phase containing total lipids was collected and evaporated to dryness under a nitrogen stream at room temperature. Residual lipids were resuspended in 500 µL of chloroform/methanol (2/1, v/v) for subsequent analysis. This work was carried out on three samples of non-treated macrophages (11 runs) and on two samples of EPA (6 runs).

## 2.3 LC-MS analysis procedure

The chromatographic system was composed of a quaternary pump with a Hewlett-Packard HP 1050 automatic injection system (Böblingen, Germany). Phospholipids were separated using an YMC PVA-Sil guard column/column (Kyoto, Japan) (10 mm and 150 mm respectively, inner diameter 2 mm and 5 µm particle diameter). The column was thermostated at 35°C with a 560-CIL column oven (Bioserv, Thiais, France). The flow-rate was set at 0.4 mL.min<sup>-1</sup> and injection volume was 10 µL. Solvent A was composed of a *n*-heptane/2-propanol (98/2, v/v); solvent B of chloroform/2-propanol (65/35, v/v) and solvent C of methanol/water (95/5, v/v). Acetic acid (1%) and triethylamine (0.08%) were added to all mobile phases to modify the ionization of phospholipids and retention time (RT).

The HPLC system was coupled with an API3000 triple quadrupole mass spectrometer (TQ-MS), (AB Sciex, Darmstadt, Germany), equipped with an ESI source in negative mode with resolution of 0.2. Solvents and analytes are introduced through a steel ionization needle set at -4000 V (negative mode) with a temperature set at 280°C. Nebulization gas and curtain gas were respectively set at 9 (arbitrary unit: a.u) and 7 (a.u). Declustering potential was set at -40, focusing potential at -400 and entrance potential at -10. Mass spectra were acquired in a full-scan mode. The *m/z* range was fixed at 350-1600. The acquisition software used was Analyst<sup>®</sup> (1.4.2). This protocol has been previously described in detail [51–53].

## 2.4 Optimizing LC-MS pretreatment and data analysis

### 2.4.1 Pretreatment with Mzmine2:

Data from LC-MS data were first converted from the proprietary Wiff data format into a common format .mzxml, using the Wiff to mzData converter (v 1.0.0.4) (AB Sciex). Data were then computed in the MzMine 2.20 toolbox. All algorithms for pretreatment steps are described in details in MZmine user manual [33, 35].

After entering all the data, the next step was obtaining a mass listing from the raw data. Centroid calculation was used to estimate the  $m/z$  ratio according to half-peak width. There are four major parameters in this step: (i) noise level, corresponding to the minimum intensity level for  $m/z$  data, (ii) minimum time span defined by the minimum acceptable time span of  $m/z$  peaks, (iii) minimum peak height specified as minimum peak intensity of the chromatogram and (iv)  $m/z$  tolerance defined by the maximum allowed  $m/z$  distance between data points.

The second step was deconvolution of the chromatogram into several peaks using an algorithm, removing the lowest part of the chromatogram below a user-specified baseline level. The remaining peaks above the baseline were recognized if they fulfilled the height and duration requirements according to three parameters (baseline level, minimum peak height and duration).

Alignment was the third step and was used to compare metabolites between the samples. The software aligned peaks in different samples by matching scores: the scoring function computes similarity based on the similarities in  $m/z$  and RT values, Equation 1. Four parameters must be specified:  $m/z$  tolerance sets the range in terms of  $m/z$  for possible peaks to be aligned; absolute RT tolerance is the maximum difference allowed for RT; weight for RT and  $m/z$ : in the case of perfectly matching between 2 peaks rows (RT or  $m/z$  values), the score is assigned to the complete weight.

$$\left( score = \left( \left( 1 - \frac{m/z \text{ difference}}{m/z \text{ tolerance}} \right) \times m/z \text{ weight} \right) + \left( \left( 1 - \frac{RT \text{ difference}}{RT \text{ tolerance}} \right) \times RT \text{ weight} \right) \right)$$

Equation 1: Matching score alignment used in join aligner in Mzmine 2

For gap filling, the software uses raw data to detect missing signals. The main parameters here are  $m/z$  and RT tolerances, which define the window in which the algorithm should find the peak. Three parameters are required for this step:  $m/z$  tolerance, RT tolerance and intensity tolerance. Finally, the data matrix generated is an  $m/z$ -RT data couple, according to a peak height.

## 2.4.2 Design of experiment (DoE): parameters and responses

A Plackett-Burman design was built using the 14 parameters of LC-MS data pre-processing. These parameters included the chromatogram builder, deconvolution and gap filling parameters (Table 1). Score alignment applies for join aligner in MZmine 2 is described according to the formula. It includes two similar terms ( $m/z$ , RT).

Weights ( $m/z$  and RT) for alignment were combined in one parameter. Center level for this parameter had the same value for  $m/z$  and RT. For high level, RT weight is more important.

The design considered also the normalizing procedure after peak deconvolution by average intensity. Normalizing is in fact defined as a qualitative parameter.

An experimental design was used. It was applied to the NT and EPA groups and is depicted as EPA/NT DoE. A total of 17 experiments were evaluated. The Plackett-Burman design was chosen to study the principal effects [54]. Upper, lower and center levels of the plan were chosen according to the analytical properties of raw mass spectral data (mass spectrometer performance, chromatographic techniques). Raw data were used to determine RT tolerances, noise levels and peak widths. LC-MS analytical properties *i.e.* mass spectrometer resolution were used to define the  $m/z$  tolerance range. Following preliminary experiments, two factors were considered: weight for  $m/z$  for alignment calculation and intensity tolerance for gap filling.

The variables count (pretreatment matrix), the number of significant variables and the number of molecular species (after discriminant analysis processing) were considered as responses of the DoE. No repetition of experiment was set. The ultimate goal was to identify the preprocessing parameters that should be set in order to eliminate redundant variables and at the same time that allows maximizing discriminant information *i.e.* discriminant variables and species count.

## 2.5 Data analysis

The Plackett-Burman evaluation was processed with multiple linear regression (MLR) using MODDE software V9 (Umetrics, Umeå, Sweden). The p-values of MLR coefficient were estimated. These coefficients correspond to significant changes from the center level to a selected high level response. The p-value was set at 0.05. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to estimate the regression model. The explained variation ( $R^2$ ) and accuracy of prediction ( $Q^2$ ) were estimated for

DoE.  $R^2$  reflects how good models can fit the data.  $Q^2$  is considered as an evaluation of the predictive power.  $Q^2$  is considered good when  $> 0.5$  and difference between  $R^2$  and  $Q^2$  is  $< 0.2-0.3$  [55].

Simca-P 12 software (Umetrics) was used for Principal Component analysis (PCA). PCA is an unsupervised method and was used for exploratory analyses of J774 murine macrophages. Differences between samples can be studied by using PCA scores. Unsupervised methods permit to describe how data self-organize behaviour. After examining data using PCA, Partial-least-squares discriminant analysis (PLS-DA) was processed. PLS-DA is a supervised method that permits to maximize between group differences and to identify experimental variables that contribute to that difference. Then, an orthogonal signal correction partial-least-squares discriminant analysis (OSCPLS-DA) was processed to discriminate NT cells and treated cells. OSC is a signal preprocessing method that dissociates discriminant and non discriminant class information [56]. The relevant variables were selected using a covariance-correlation plot of the t scores and X variables obtained from OSCPLS-DA processing. PLS-DA coefficients were scaled and centered.

Student tests were performed on the intensities of discriminant variables between NT and EPA groups. Statistical significances were defined for p-value  $< 0.01$  (Figure 3). Finally, the  $m/z$  values of relevant variables were entered in the lipid search database ([www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)) to propose possible molecular structures, before determining them in further  $MS^2$  analyses. The schematic of the workflow applied in the present study is illustrated in Figure 1.

## 3 Results

### 3.1 Optimizing LC-MS data pretreatment

Polymerized poly(vinyl alcohol) on silica gel (PVA-Sil<sup>®</sup>) column was used to separate a large number of lipid classes including glycerophospholipids and sphingolipids. Lipidomic profiling using NP-HPLC and mass spectrometry has been used in several previous studies [51–53, 57, 58]. In these works, quantification of lipid classes and identification of molecular species of lipids have been conducted in biological samples.

Macrophages are known to have an important role in atherosclerosis. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have been studied in the context of the prevention of cardiovascular diseases.

Incorporating PUFAs in membranes modifies their composition [59]. In our work, phospholipids modifications in J774 murine macrophages were assessed using EPA.

Descriptive statistics were presented for all DoE i.e. mean, standard deviation, minimum and maximum (n=17). It permits to show how response changes if pretreatment parameters are different. For each model, non significant pretreatment parameters were excluded (p-value > 0.05). For each MLR model, an ANOVA analysis was performed to compare mean squares regression with mean squares residual (Table 3). MLR coefficients for the 3 models, confidence intervals and p-values were collected for selected responses to analyze the effect of these parameters (Table 4). These coefficients were obtained for scaled and centered data.

### **3.1.1 Descriptive statistics and ANOVA test**

Table 2 presents parameters combination for each experiments, responses and descriptive statistics. All responses varied when pretreatment parameters were modified. Means for variables count is  $375.0 \pm 339.8$ . Dispersion around the average is large for this criterion. Mean for discriminant variables and species counts are respectively  $29.6 \pm 19.55$  for discriminant variables count and  $14.41 \pm 5.81$  for species count.

All ANOVA tests were significant ( $p < 0.01$ ; Table 3). In other words, F-test between mean squares regression and mean squares residual are significant for the three regression models. The explanation of variations were acceptable, with  $R^2 > 0.65$  and with acceptable prediction capacity, with  $Q^2 > 0.49$ .

### **3.1.2 Variables count**

Among the seven parameters of the chromatogram builder and the deconvolution steps, only three were significant: noise level, minimum time span and baseline level. Moreover, absence of normalizing enabled the variables count to be increased. Decreasing some parameters of chromatogram builder (noise level or minimum time span) and changing a deconvolution parameter (such as baseline level) led to an increase in variables' count.

### 3.1.3 Discriminant variables count

We defined discriminant variables count according to the dimensions on S-plots. These S-plots were conducted after OSCPLS-DA between two groups i.e. NT versus EPA groups. The variables were considered to be discriminant when correlation coefficients were higher than 0.7 and covariance values higher than 0.05. The discriminant variables count reflects the relationship between pretreatment and the matrix ability to highlight discriminant information. Compared to the number of variables directly issued from the pretreatment of raw data, the number of discriminant variables reflects the effect on statistical results. Only normalization is significant for this regression with positive effect (p-value =6.20E-06). Normalization by average intensity after deconvolution step can lead to decrease discriminant information.

### 3.1.4 Species Count

The Species Count represents the number of unique molecular species present in the discriminant variable set. Based on the resulting groups, the number of species to identify would vary.

Two parameters are significant for this criterion. Normalization presents a positive effect (p-value: 7.72E-04) and minimum time span (chromatogram builder parameters) has a negative effect (p-value: 1.44E-02). Species count can decrease when normalizing and increasing the minimum time span in deconvolution step.

To summarize, a DoE was performed to identify influent pretreatments parameters. DoE also allowed to adjust the parameters settings in order to eliminate redundant variables without losing discriminant information. For all criteria, significant parameters belong to chromatogram builder and deconvolution step. These steps play a key role in pretreatment workflow. Indeed, chromatogram builder and deconvolution step permit to create variables' list.

The linear normalizer must be used carefully to avoid missing some discriminant information. For this, our matrices were defined without normalization by averaging peak intensities after the deconvolution step.

In a way to decrease redundant variables, noise level and the minimum height were set at 1.5E+05 in the chromatogram builder step. Since this level is close to the low level of DoE. Minimum

time span was set at 0.3 second, corresponding to the center level in DoE. An increase of the minimum time span reduced the variables and species' counts.

Other parameters were set in order according to the properties of our LC-MS device. RT tolerance was set to 1 minute, corresponding to the low level in DoE and  $m/z$  tolerance was set to 0.3 *uma*. Table 1 resumes the defined levels for pretreatment parameters. The matrix on which the statistical analyses were processed contained 1033 variables.

## **3.2 Application of chemometrics analysis of LC-MS data obtained from J774 murine cell phospholipids**

### **3.2.1 Chemometric analysis**

The first two principal components of the PCA represented more than 40% of data variability (36.4% and 7.3% for the two first components). The prediction capacity of the model ( $Q^2$ ) was 22.7%. The score plot of the first two components enabled to distinguish two groups according to the first component (NT group and EPA group).

For PLS-DA, two principal components were computed and explained 99.9 % of class information ( $R^2Y=0.9992$ ) and about 42% of the X variables ( $R^2X= 0.428$ ). Correct prediction capacity was expressed by the cumulated  $Q^2$  value of 0.968. Figure 2A illustrates PCA and Figure 2B PLS-DA score plots. OSC preprocessing operations were conducted between the NT and EPA groups.

Only one latent variable was calculated and explained more than 99% of the class information ( $R^2Y = 0.999$ ). The  $Q^2$  value for prediction capacity was 0.981. These models were used in order to detect variables characterizing the most important changes between NT and EPA groups. Figure 3 illustrates score plots and S-plots.

### **3.2.2 Identification of variables of interest**

Phospholipid' classes PI, PE, PC were the major classes with over- or under-expressed species (Figure 4A, 4B). For the NT group versus EPA group: (i) PI species ( $m/z$  911.6 and 857.6) were overexpressed with a simultaneous decrease of PI  $m/z$  861.9; (ii) PE species were overexpressed in NT the group and mainly represented by  $m/z$  742.4, 716.6 and 700.4 and (iii) for PC species, one of them

( $m/z$  866.5) increased in the EPA group and four molecular species were overexpressed in the NT group ( $m/z$  830.6, 844.2, 818.8 and 804.6).

The general trend was an overexpression for PL species in all PL classes and these modifications were mainly found for PC, PI and PE. The overload of EPA in murine macrophages was in fact associated with an overexpression of PI species  $m/z$  911.6. As a result of the large number of PL, only PI species ( $m/z$  911.6) were identified using a tandem mass spectrometer. The spectra are shown in Supplement data Figure S1. The fragmentation of PI was studied as those previously described by Hsu et al., and Pulfer et al. [60, 61].

Several specific ions characteristic of the polar head of inositol groups were observed at  $m/z$  314.9 [glycerophosphoinositol. -H<sub>2</sub>O]-, 296.99 [glycerophosphoinositol -2H<sub>2</sub>O]-. The  $m/z$  283.2 and 329.2 ions corresponded to the fatty acids substituents C18:0, C22:5, respectively. The sn1 positions were attributed to C18:0. The neutral loss of sn1 and sn2 substituents as fatty acids ( $m/z$  627.3 and 581.2) and as a ketene yielded ions at  $m/z$  599.2 or 483.3 and then the relative intensity of these ions enabled this attribution.

## 4 Discussion

Pretreatment is an essential step for processing LC-MS data. Unlike chemometric analysis which is a relatively well established methodology [62], pretreatment is specific (sometimes unique) for a given set of data and depends also on the proposed pretreatment software and algorithms. LC-MS data in this study were processed using Mzmine 2. In particular, algorithms for the deconvolution (baseline level algorithm) and alignment (join aligner) steps were studied. Many steps and parameters are implicated in pretreatment.

Therefore, DoE methods were used in order to study the relationship between pretreatment and discriminant information that can be obtained with a biological dataset. Biological model used were NT *versus* EPA groups.

In the present paper, Plackett Burman design is used in a screening study on pretreatment parameters applied to non targeted analyses for lipidomic data. Data were collected from biological samples: J774 macrophages. The objective of this design was to identify pretreatment parameters that should be set in order to eliminate redundant variables and at the same time maintaining discriminant information, especially that the modifications when treating two biological datasets (treated and non-

treated) are most of the time barely detectable. In order to set pretreatment parameters, LC-MS characteristics must be considered and permitted to define low and high level of DoE.

To investigate pretreatment influences, variables count was chosen in order to explore which parameters can decrease the matrix dimensions. Discriminant variables and species' count were evaluated to appreciate recorded results after statistical processing. For each model, only significant pretreatment parameters were considered. ANOVA analyses were processed to compare mean squares regression and mean squares residual. ANOVA tests were significant for the three models. A measure of  $R^2$  and  $Q^2$  was also used to assess model validity; their values were acceptable since we are processing a biological dataset. Plackett-Burmann design highlighted the importance of two pretreatment steps: the chromatogram builder and the deconvolution steps. The latter parameters define the dimensions of the pretreated matrix and should be adjusted properly to improve the dimensions of the pretreated matrix.

Normalization after deconvolution step by average intensity was involved in all selected criteria. Normalization implicated a decrease in discriminant variables count. This could be explained by the fact that probably normalizing using average intensity is not suitable when processing biological dataset. In our case, we lost some discriminant information.

In this study, PL classes were separated using NP-HPLC, the first step in the identification of molecular species by PL classes using retention times. Chromatographic peaks were broad because they contained many molecular species of one PL class. The alignment of matching peaks is specific for this technique. Other methods can be used to determine a RT offset between PL classes in terms of total ion intensity and molecular species retention by selecting a specific ion.

The chromatographic method was coupled with a triple quadrupole mass spectrometer. This instrument is characterized by low resolution and an acquisition frequency of  $0.4 \text{ scans.s}^{-1}$  for mass spectrum. The  $m/z$  tolerance was therefore set at 0.3 uma for the chromatogram builder, alignment and gap filling sets. This value was close to system resolution. The minimum time span in the chromatogram builder step was set at  $0.4 \text{ scans.s}^{-1}$  and corresponded to maximal acquisition frequency of the spectrometer. The center level for minimum time span was set at 0.3 second and this parameter was significant for variables and species counts.

After chemometric analysis, EPA and NT datasets presented some discriminant lipids. More precisely, some phospholipids showed high correlation and covariance after S-plot projection. Statistical analysis revealed 10 under- or over-expressed molecular species (2 PI, 3 PE, 5 PC).

Since pretreatment parameters affected the LC-MS statistical analysis, we determined whether the PI *m/z* 911.6 was over-expressed in all experiments for EPA/NT DoE. PI *m/z* 911.6 was not representative as a discriminant variable in some EPA/NT DoE experiments. This can be explained by the noise level of samples, the deconvolution step or the misalignment of chromatogram peaks.

According to our previous design, we defined optimal pretreatment parameters and applied it to our biological models.

## 5 Conclusion

After EPA supplementation, the PI (18:0/22:5) was over-expressed for EPA group. Docosapentaenoic acid (DPA) is the elongation product of EPA and its incorporation into PL species was previously reported [47]. Among the six major species of PL in eukaryotes, PI only contributes about 2-10% of the total PL pool but plays a critical role in the regulation of several fundamental cellular processes. Studying specific roles of molecular PL species in the physiology of macrophages is currently an emerging research field. The involvement of PI and its arachidonic acid content in cholesterol efflux and in polarization of the macrophages, respectively, was very recently reported [63, 64].

The experimental designs built to estimate the effect of pretreatment parameters for LC-MS data processing have shown the importance of certain parameters. Chromatogram builder and deconvolution steps are determinant pretreatment parameters. To increase the variables count, chromatogram builder and deconvolution steps should be adjusted properly. Normalizing showed to be less determinant for biological datasets. However, to adjust these parameters, the user should take into account the performance features of the device that permitted to record data. For example herein, mass spectrometer features such as resolution, acquisition frequency and chromatographic peak shape were considered. Preprocessing is more critical when processing biological data as the discriminant information could be reduced to slight modifications. Our study showed that PI molecular species are modified in murine macrophages cultured with EPA and confirmed the importance of the pretreatment step.

### Acknowledgment

Guillaume Sayet PhD thesis is funded by Ministry of Education and Research, France. We gratefully acknowledge Dr Sylviane Tardivel for technical assistance and advices for cell culture. This study was realized in the framework of the "lipidomic profiling project" funded by the CORDDIM and MALINF initiative of Région Ile de France and Université Paris-Sud

**Declaration on conflict of interest:** Authors declare that there is no conflict of interest.

## References

1. Nishiumi S, Suzuki M, Kobayashi T, Matsubara A, Azuma T, Yoshida M (2014) Metabolomics for Biomarker Discovery in Gastroenterological Cancer. *Metabolites* 4:547–571
2. Kordalewska M, Markuszewski MJ (2015) Metabolomics in cardiovascular diseases. *J Pharm Biomed Anal* 113:121–136
3. Watson AD (2006) Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res* 47:2101–2111
4. Alex Brown H (2012) Lipidomics: when apocrypha becomes canonical. *Curr Opin Chem Biol* 16:221–226
5. Navas-Iglesias N, Carrasco-Pancorbo A, Cuadros-Rodríguez L (2009) From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *TrAC Trends Anal Chem* 28:393–403
6. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S (2011) Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1811:637–647
7. Tohge T, Fernie AR (2009) Web-based resources for mass-spectrometry-based metabolomics: A user's guide. *Phytochemistry* 70:450–456
8. Fahy E, Cotter C, Byrnes R, Manish S, Maer A, Li J, Nadeau D, Zhou Y, Subramaniam S (2007) Bioinformatics for Lipidomics. *Methods Enzymol* 432:247–273
9. Schmeltzer K, Fahy E, Subramaniam S, Dennis EA (2007) The Lipid Maps Initiative in Lipidomics. *Methods Enzymol* 432:171–183
10. Carrasco-Pancorbo A, Navas-Iglesias N, Cuadros-Rodríguez L (2009) From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *TrAC Trends Anal Chem* 28:263–278
11. Seppänen-Laakso T, Orešič M (2009) How to study lipidomes. *J Mol Endocrinol* 42:185–190
12. Roberts LD, McCombie G, Titman CM, Griffin JL (2008) A matter of fat: An introduction to lipidomic profiling methods. *J Chromatogr B* 871:174–181
13. Christie WW (1986) Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the “mass detector.” *J Chromatogr A* 361:396–399
14. Christie WW, Morrison WR (1988) Separation of complex lipids of cereals by high-performance liquid chromatography with mass detection. *J Chromatogr A* 436:510–513
15. Leiker TJ, Barkley RM, Murphy RC (2011) Analysis of diacylglycerol molecular species in cellular lipid extracts by normal-phase LC-electrospray mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* 305:103–108
16. McLaren DG, Miller PL, Lassman ME, Castro-Perez JM, Hubbard BK, Roddy TP (2011) An ultraperformance liquid chromatography method for the normal-phase separation of lipids. *Anal Biochem* 414:266–272
17. Chen S, Belikova NA, Subbaiah PV (2012) Structural elucidation of molecular species of pacific oyster ether amino phospholipids by normal-phase liquid chromatography/negative-ion electrospray ionization and quadrupole/multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 735:76–89
18. Sokol E, Almeida R, Hannibal-Bach HK, Kotowska D, Vogt J, Baumgart J, Kristiansen K, Nitsch R, Knudsen J, Ejsing CS (2013) Profiling of lipid species by normal-phase liquid chromatography, nanoelectrospray ionization, and ion trap–orbitrap mass spectrometry. *Anal Biochem* 443:88–96
19. Yamada T, Uchikata T, Sakamoto S, Yokoi Y, Fukusaki E, Bamba T (2013) Development of a lipid profiling system using reverse-phase liquid chromatography coupled to high-resolution mass

- spectrometry with rapid polarity switching and an automated lipid identification software. *J Chromatogr A* 1292:211–218
20. Hu C, van der Heijden R, Wang M, van der Greef J, Hankemeier T, Xu G (2009) Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *J Chromatogr B* 877:2836–2846
  21. Núñez O, Gallart-Ayala H, Martins CPB, Lucci P, Busquets R (2013) State-of-the-art in fast liquid chromatography–mass spectrometry for bio-analytical applications. *J Chromatogr B* 927:3–21
  22. Lída M, Cífková E, Holčápek M (2011) Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:5146–5156
  23. Dugo P, Fawzy N, Cichello F, Cacciola F, Donato P, Mondello L (2013) Stop-flow comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection for phospholipid analysis. *J Chromatogr A* 1278:46–53
  24. Postle AD, Wilton DC, Hunt AN, Attard GS (2007) Probing phospholipid dynamics by electrospray ionisation mass spectrometry. *Prog Lipid Res* 46:200–224
  25. Cui Z, Thomas MJ (2009) Phospholipid profiling by tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877:2709–2715
  26. Imbert L, Gaudin M, Libong D, Touboul D, Abreu S, Loiseau PM, Laprévotte O, Chaminade P (2012) Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani*. *J Chromatogr A* 1242:75–83
  27. Xian F, Hendrickson CL, Marshall AG (2012) High Resolution Mass Spectrometry. *Anal Chem* 84:708–719
  28. Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, Wilson ID (2014) Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J Pharm Biomed Anal* 87:12–25
  29. Makarov A, Scigelova M (2010) Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217:3938–3945
  30. Dunn WB, Erban A, Weber RJM, Creek DJ, Brown M, Breitling R, Hankemeier T, Goodacre R, Neumann S, Kopka J, Viant MR (2013) Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* 9:44–66
  31. Hibbert DB (2012) Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J Chromatogr B* 910:2–13
  32. Hecht ES, Oberg AL, Muddiman DC (2016) Optimizing Mass Spectrometry Analyses: A Tailored Review on the Utility of Design of Experiments. *J Am Soc Mass Spectrom* 27:767–785
  33. Katajamaa M, Orešič M (2005) Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics* 6:179
  34. Katajamaa M, Orešič M (2007) Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J Chromatogr A* 1158:318–328
  35. Castillo S, Gopalacharyulu P, Yetukuri L, Orešič M (2011) Algorithms and tools for the preprocessing of LC–MS metabolomics data. *Chemom Intell Lab Syst* 108:23–32
  36. Cajka T, Fiehn O (2014) Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography–mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 61:192–206
  37. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M (2010) MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11:395
  38. Gürdeniz G, Kristensen M, Skov T, Dragsted LO (2012) The Effect of LC-MS Data Preprocessing Methods on the Selection of Plasma Biomarkers in Fed vs. Fasted Rats. *Metabolites* 2:77–99
  39. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868–874
  40. Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH (2009) The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl:S189-194

41. Gall J, Frisdal E, Bittar R, Le Goff W, Bruckert E, Lesnik P, Guerin M, Giral P (2016) Association of Cholesterol Efflux Capacity With Clinical Features of Metabolic Syndrome: Relevance to Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 5:
42. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Favari E, Yancey PG, Kellner-Weibel G (2002) Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations. *Atherosclerosis* 163:1–8
43. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, French BC, Phillips JA, Mucksavage ML, Wilensky RL, Mohler ER, Rothblat GH, Rader DJ (2011) Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 364:127–135
44. Tall AR (2008) Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* 263:256–273
45. Zarubica A, Trompier D, Chimini G (2007) ABCA1, from pathology to membrane function. *Pflugers Arch* 453:569–579
46. Fournier N, Attia N, Rousseau-Ralliard D, Védie B, Destailats F, Grynberg A, Paul J-L (2012) Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1821:303–312
47. Fournier N, Tardivel S, Benoist J-F, Védie B, Rousseau-Ralliard D, Nowak M, Allaoui F, Paul J-L (2016) Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux via a protein kinase A signaling pathway in primary human macrophages. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1861:331–341
48. Mozaffarian D, Wu JHY (2011) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol* 58:2047–2067
49. Yokoyama M, Origasa H (2003) Effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in Japanese patients with hypercholesterolemia: rationale, design, and baseline characteristics of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Am Heart J* 146:613–620
50. Folch Jo, Lees M, Sloane Stanley G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
51. Deschamps FS, Chaminade P, Ferrier D, Baillet A (2001) Assessment of the retention properties of poly (vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography. *J Chromatogr A* 928:127–137
52. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM (2007) Miltefosine Affects Lipid Metabolism in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1425–1430
53. Imbert L, Ramos RG, Libong D, Abreu S, Loiseau PM, Chaminade P (2012) Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. *Anal Bioanal Chem* 402:1169–1182
54. Plackett R., Burman J. (1946) The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika* 33:305–325
55. Eriksson L, Umetrics AB (2000) Design of experiments: principles and applications. Umetrics AB, Umea
56. Wold S, Antti H, Lindgren F, Öhman J (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemom Intell Lab Syst* 44:175–185
57. Essaid D, Rosilio V, Daghdjian K, Solgadi A, Vergnaud J, Kasselouri A, Chaminade P (2016) Artificial plasma membrane models based on lipidomic profiling. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1858:2725–2736
58. Moulin M, Solgadi A, Veksler V, Garnier A, Ventura-Clapier R, Chaminade P (2015) Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. *Biol Sex Differ* 6:20 . doi: 10.1186/s13293-015-0039-5
59. Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B (2015) Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 12:10–17
60. Hsu F-F, Turk J (2000) Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: a mechanistic study. *J Am Soc Mass Spectrom* 11:986–999

61. Pulfer M, Murphy R (2003) Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev* 22:332–64
62. Boccard J, Rutledge DN (2013) A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Anal Chim Acta* 769:30–39
63. Gulshan K, Brubaker G, Conger H, Wang S, Zhang R, Hazen SL, Smith JD (2016) PI(4,5)P2 Is Translocated by ABCA1 to the Cell Surface Where It Mediates Apolipoprotein A1 Binding and Nascent HDL Assembly. *Circ Res* 119:827–838
64. Montenegro-Burke JR, Sutton JA, Rogers LM, Milne GL, McLean JA, Aronoff DM (2016) Lipid profiling of polarized human monocyte-derived macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 127:1–8

## Legend for Tables and Figures

### TABLES

Table 1: Upper, lower and center levels of pretreatment parameters and level parameters used for pretreatment

Table 2: Parameters levels for each experiments and results corresponding. Descriptive statistics were presented for each criterion (mean, standard deviation, minimum and maximum). 1 correspond to high level of pretreatment parameters, -1 correspond to low level of pretreatment parameters and 0 correspond to a center level. Chromatogram builder step (A: noise level, B: Minimum time span, C: Minimum height, D: m/z tolerance); Deconvolution step using baseline level algorithm (E: Minimum peak height, F: Peak duration, G: baseline level), alignment using join aligner algorithm (H: m/z tolerance, I: weight (RT, m/z), J: RT tolerance); Gap filling step (K: intensity tolerance, L: m/z tolerance, M : RT tolerance); N : Normalization (average intensity after deconvolution step)

Table 3: ANOVA tables and fit measures ( $R^2, Q^2$ ) for each response for EPA/NT DoE. (DF: degree of freedom, SS: sum of square, MS: mean square, F: the F-statistic, SD: standard deviation, p: the p-value)

### FIGURES

Figure 1: Scheme of the different steps applied in this study

Figure 2: Scores plot of LC-MS phospholipids profiles obtained from non-treated J774 macrophages (NT) and J774 macrophages supplemented with 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  of EPA during 34 hours (EPA) using principal component analysis (A) and PLS-DA (B)

Figure 3 : Scores plot obtained by PLS-DA with OSC preprocessing obtained by LC-MS phospholipids profiles from non-treated J774 macrophages (NT) and J774 macrophages supplemented with 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  of EPA during 34 hours (EPA) and covariance-correlation plot of the t-scores and X variables between non-treated (NT) versus EPA groups. Red area shows the variables that are considering discriminant (correlation superior to 0.7 and covariance superior to 0.05)

Figure 4: Analysis of m/z intensity of discriminant phospholipids between non-treated J774 macrophages (NT) and J774 macrophages supplemented with 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  of EPA (EPA). Results were expressed by mean intensity  $\pm$  SEM (6 objects for EPA group and 9 objects for NT group). (A) corresponds to PI and PE discriminant species between the 2 groups and (B) corresponds to PC species

Figure S1: MS/MS spectra of m/z 911.6 (a) and m/z 885.6 (b) and corresponding to PI species  $[\text{M}-\text{H}]^-$

**TABLES**

**Table 1**

	Step parameters	Units	Low level	High level	Center level	Level parameters used
Chromatogram builder	Noise level	Intensity	1.0E+05	4.0E+05	2.0E+05	1.5E+05
	Minimum time span	Sec.	0.1	0.5	0.3	0.3
	Minimum height	Intensity	1.0E+05	4.0E+05	2.0E+05	1.5E+05
	m/z tolerance	uma	0.3	0.9	0.6	0.3
Deconvolution	Minimum peak height	Intensity	1.0E+05	4.0E+05	2.0E+05	1.5E+05
	Peak duration	Min.	0.4-0.8	0.2-1.5	0.3-1	0.3-1.5
	Baseline level	Intensity	1.0E+05	4.0E+05	2.0E+05	1.5E+05
Alignment	m/z tolerance	Uma	0.3	0.9	0.6	0.3
	Weight (RT; m/z)	Min; uma	(10, 20)	(20; 10)	(15, 15)	(10, 20)
	RT tolerance	Min.	1	2	1.5	1
Gap filling	Intensity tolerance	Intensity (%)	10	40	25	40
	m/z tolerance	Uma	0.3	0.9	0.6	0.3
	RT tolerance	Min.	1	2	1.5	1
Normalizing (average intensity after peak deconvolution)			No	Yes	No	No

**Table 2**

Experience number	Chromatogram builder step				Deconvolution step			Alignment Step			Gap filling step			N	Responses		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		Variable count	Discriminant variables count	Species count
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	Yes	263	10	8
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	Yes	127	6	6
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	No	126	45	16
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	Yes	64	4	4
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	No	446	47	16
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	Yes	309	20	16
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	Yes	266	14	12
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	No	527	55	21
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	No	65	19	10
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	Yes	153	15	12
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	No	1088	50	24
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	No	98	35	21
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	No	584	41	14
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	Yes	586	16	13
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	Yes	86	12	12
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	No	1192	64	16
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	No	396	50	24
Descriptive statistics														Mean	375.06	29.59	14.41
														SD	339.79	19.55	5.81
														Min	64	4	4
														Max	1192	64	24

**Table 3**

		DF	SS	MS	F	p
Variables count	Total corrected	16	1.8E+11	115455		
	Regression	4	1.4E+11	359279	105.1	<0.001
	Residual	12	4.10E+05	34180.9		
						R <sup>2</sup> =0.778 - Q <sup>2</sup> = 0.704
		DF	SS	MS	F	P
Discriminant variables count	Total corrected	16	6112,1	382		
	Regression	1	4608,3	4608.4	459.6	<0.001
	Residual	15	1503,7	100.2		
						R <sup>2</sup> =0.754 - Q <sup>2</sup> =0.687
		DF	SS	MS	F	p
Species count	Total corrected	16	540.1	337.6		
	Regression	2	351.3	175.6	130.2	0.001
	Residual	14	188.8	134.8		
						R <sup>2</sup> =0.650 - Q <sup>2</sup> =0.493

## FIGURES

Figure 1

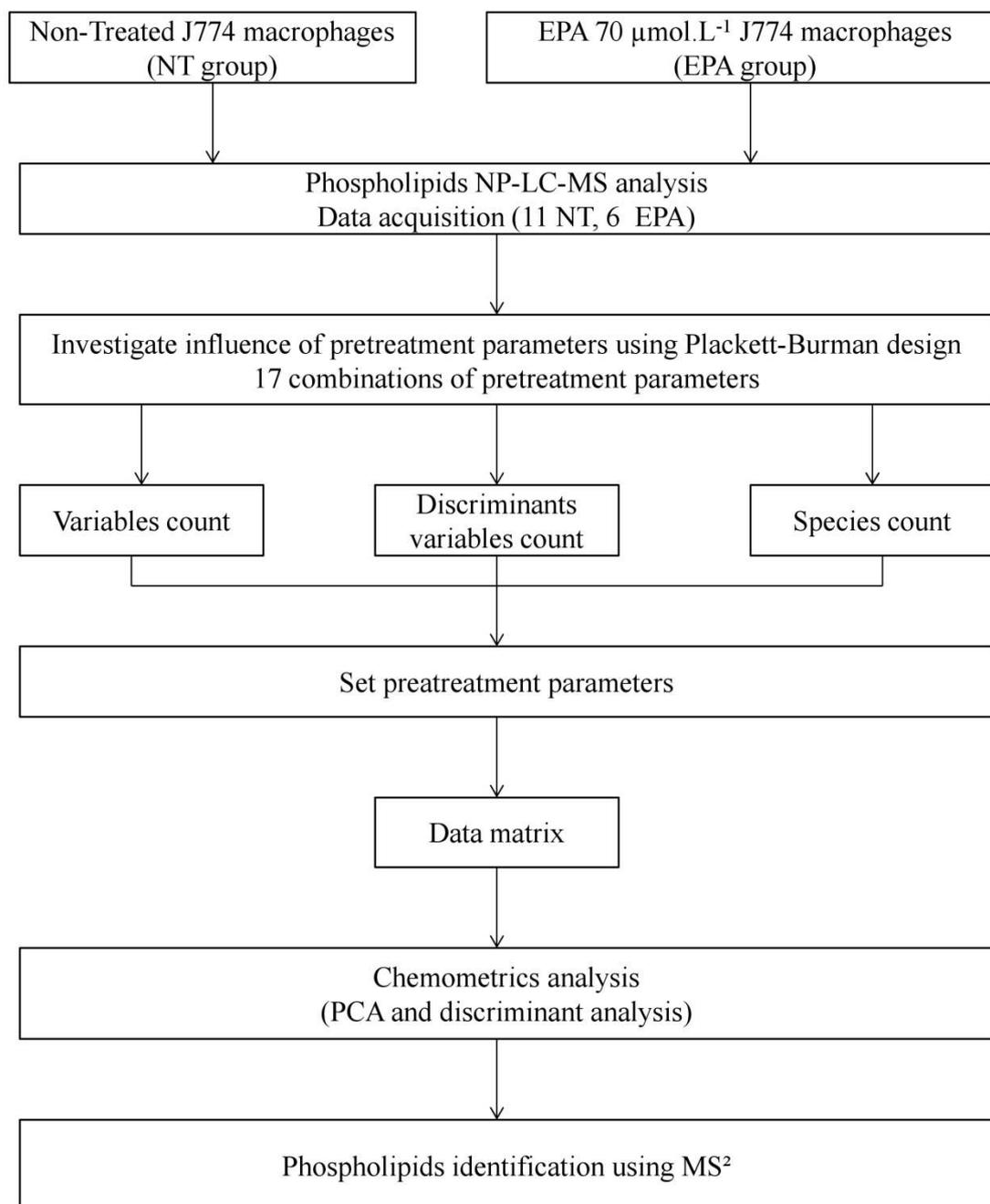


Figure 2

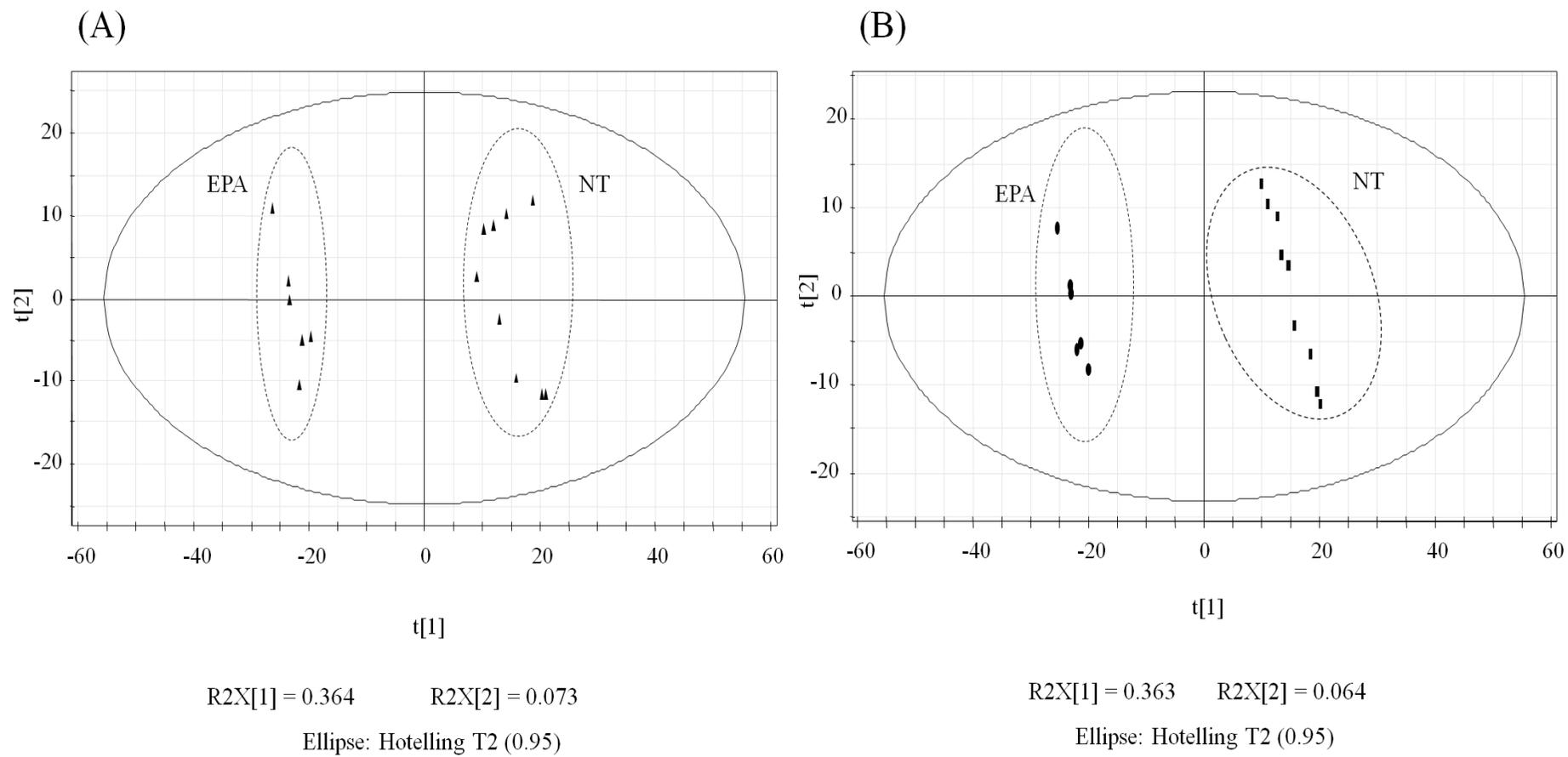
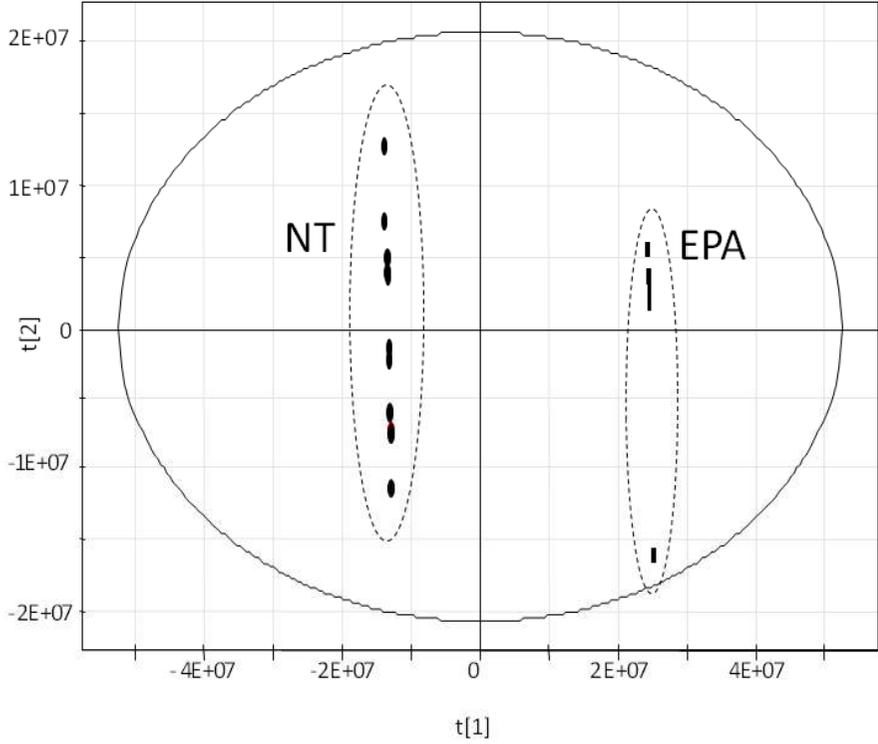
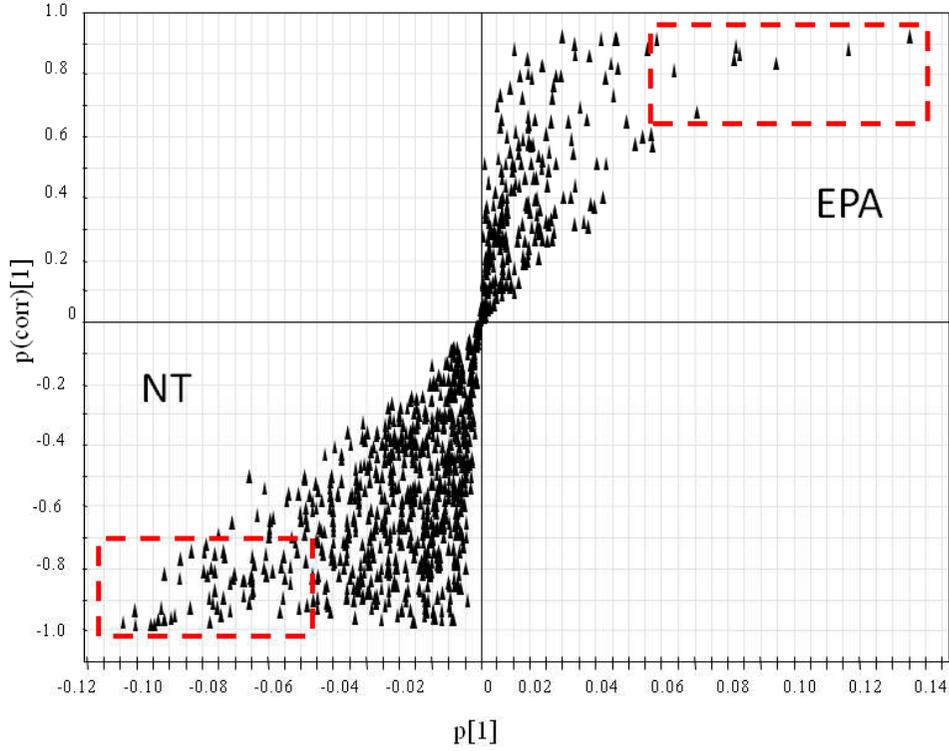


Figure 3



$R2X[1] = 0.365$   $R2X[2] = 0.058$   
Ellipse: Hotelling T2 (0.95)



$R2X[1] = 0.365$

Figure 4

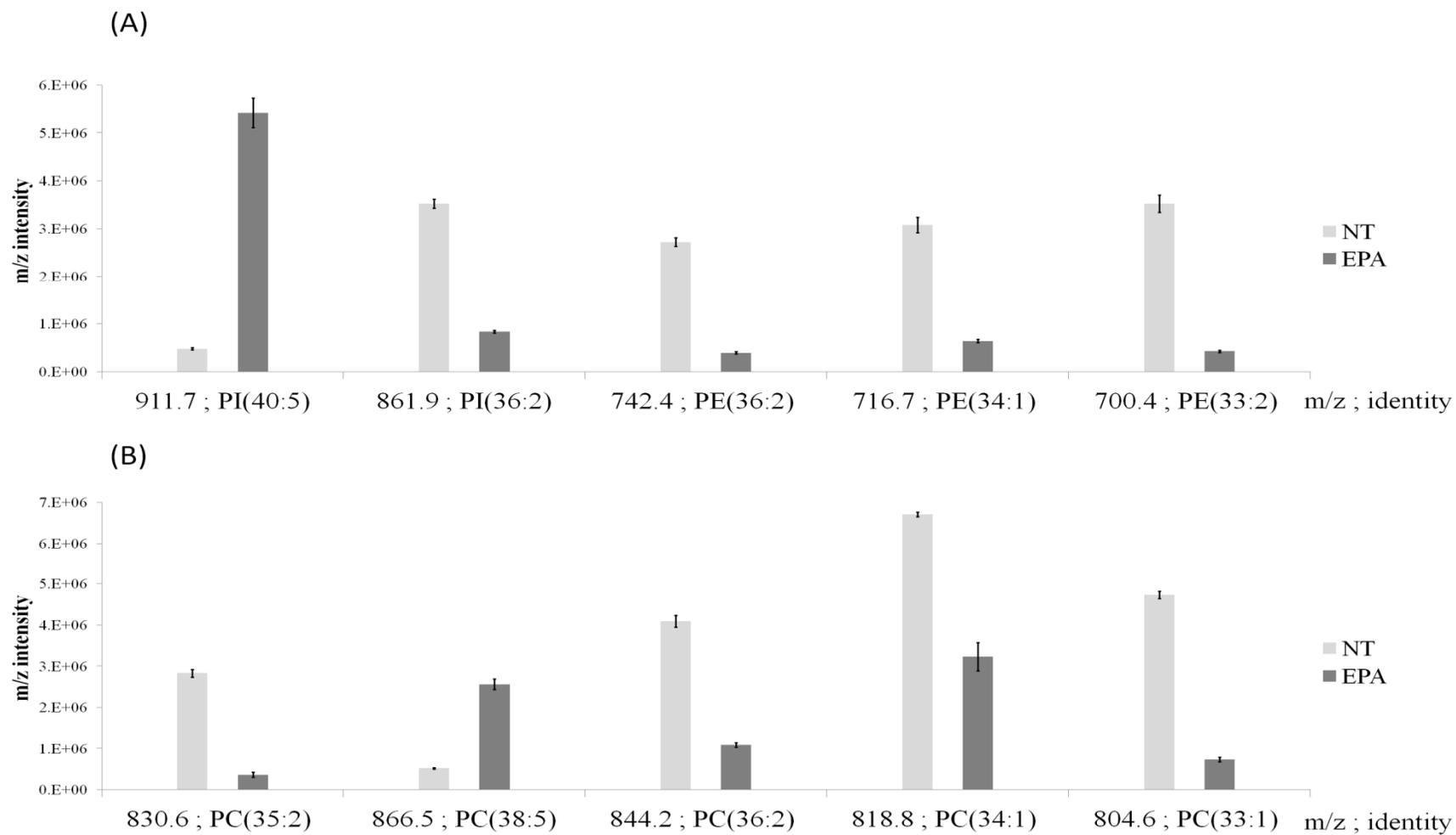
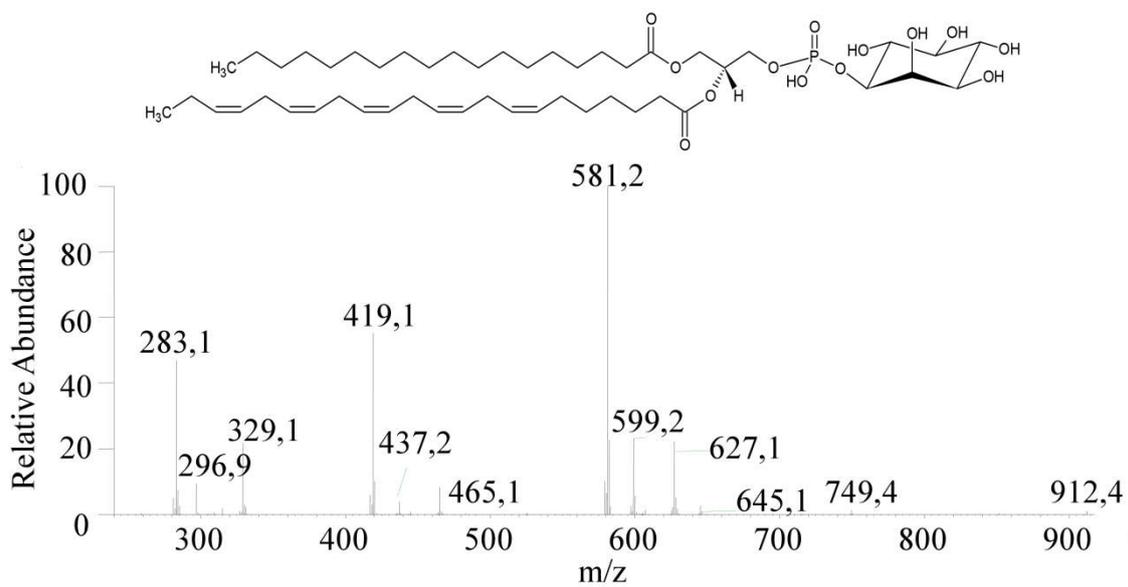


Figure S1





# **Chapitre 4 : Etude lipidomique descriptive de différents types de macrophages**

# 1 Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons pu montrer que l'apport d'AG  $\omega$ 3 pouvait modifier les profils phospholipidiques des membranes de macrophages de Souris J774. Il s'agit d'une lignée de cellules de type macrophagique issues d'un sarcome murin douées d'une capacité de prolifération importante et relativement faciles à entretenir et cultiver. Leur utilisation est donc particulièrement intéressante puisque le temps nécessaire pour obtenir un grand nombre de cellules peut être estimé à une semaine ce qui permet donc d'obtenir une population d'échantillons significative dans un temps très court. Au contraire, les macrophages humains en culture primaire (human monocyte derived-macrophages ou HMDM) sont obtenus après un temps relativement long. En effet, 11 à 15 jours sont nécessaires pour différencier les monocytes, isolés du sang total d'un donneur, en macrophages. De plus, pour avoir un nombre suffisant de monocytes au départ, il est nécessaire de partir d'un volume de sang important (300 mL). L'avantage d'utiliser ce type de cellule est que les résultats sont plus facilement transposables à l'Homme. Ainsi, nous avons privilégié l'utilisation des monocytes-macrophages humains plutôt que les lignées cellulaires au détriment de la rapidité d'obtention des résultats. Il existe aussi un modèle cellulaire « intermédiaire » que sont les THP1. Il s'agit d'une lignée de monocytes dérivés d'un enfant d'un an atteint de leucémie aiguë myélo-monocytaire. Ces monocytes ont donc l'avantage d'être d'origine humaine, d'être faciles à maintenir en culture et leur différenciation en macrophages demande une semaine.

Il s'agit des trois modèles de macrophages les plus souvent retrouvés dans la littérature, les travaux utilisant les lignées cellulaires comme les J774 ou les THP1 étant les plus nombreux en raison de leur facilité d'obtention et d'utilisation. Jusqu'à encore très récemment, il était considéré que des résultats obtenus avec une lignée de cellules murines étaient transposables à tous les types de macrophages, y compris les macrophages humains. Il est toutefois apparu ces dernières années que les résultats obtenus dans un modèle n'étaient pas systématiquement équivalents à ceux obtenus dans un autre type de macrophages. Pour rester dans le domaine du métabolisme des lipides, il a été montré que des mécanismes de régulation de voies métaboliques gouvernant l'homéostasie du cholestérol pouvaient être différents. Ainsi, il est connu que si l'AMPc stimule la transcription du gène codant l'ABCA1 dans les macrophages de Souris, il n'a aucun effet dans les macrophages humains (THP1 et HMDM). De même, si une surcharge en cholestérol réprime l'expression du SR-BI (CLA-1 chez l'Homme) des macrophages murins, il n'en est pas de même dans les macrophages humains où il joue un rôle non négligeable dans l'efflux du cholestérol cellulaire vers les HDL. Un autre exemple est le rôle de l'ABCG1 chez l'Homme dans l'homéostasie du cholestérol qui est beaucoup plus ambiguë que chez la Souris<sup>306,307</sup>. Enfin, nous avons nous-mêmes montré au laboratoire que l'incorporation d'AGPI

dans les PL de la membrane plasmique n'avait pas du tout la même conséquence sur l'efflux du cholestérol entre des J774 et des HMDM<sup>282</sup>.

Les niveaux d'expression des gènes et leur régulation ainsi que celle des voies métaboliques aboutissant à des concentrations de métabolites produits variables selon le type cellulaire peuvent expliquer les différences observées entre les modèles cellulaires. Les différentes techniques pour l'analyse des constituants cellulaires sont devenues particulièrement performantes ces dernières années. Dans le domaine de la métabolomique, les techniques de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse sont de plus en plus utilisées pour déterminer des différences de compositions entre deux groupes d'échantillons. Le premier groupe est souvent un échantillon témoin et le second, un échantillon ayant reçu ou non un stimulus, un stress ou une molécule pharmacologiquement active. Ces techniques couplées permettent d'accéder à un grand nombre d'informations comme la concentration ou la structure et la quantité de données issues de ces techniques est considérable. Ceci nécessite d'utiliser des méthodes de traitement de l'information servant tout particulièrement à détecter les sources de variance au sein de deux groupes d'échantillons. Des différences significatives de concentrations de certains métabolites découlent des hypothèses métaboliques pouvant expliquer ces changements de composition. Ces méthodes analysant les sources de variances ou chimiométrie sont désormais indispensables à utiliser pour effectuer une analyse globale des différences entre des groupes d'échantillons.

*A contrario*, une partie des informations chimiques fournies est ignorée. En effet, il est très difficile d'analyser et d'identifier l'ensemble des constituants d'une cellule qui permettrait de construire une cartographie des témoins que les expérimentateurs vont potentiellement modifier. Cet état des lieux pourrait pourtant être très intéressant puisque l'utilisation de la chimiométrie nous fournit des informations sur les variations quantitatives des métabolites et la cartographie métabolomique préalable nous fournirait l'information des métabolites qui ne sont pas modifiés par le stimulus appliqué. Ceci permettrait sans doute de faire le tri parmi les hypothèses métaboliques et de les affiner. Contrairement à ce qui a été réalisé pour le génôme, il n'existe, à notre connaissance, que très peu de travaux ayant établi le lipidome de différents types cellulaires.

Dans le contexte des thématiques de l'équipe de biologie de Lip(Sys)<sup>2</sup>, il nous a semblé important d'établir une cartographie la plus exhaustive possible des glycérophospholipides et des sphingolipides des HMDM à l'état « quiescent », à savoir tout de suite après la fin de leur différenciation de monocytes en macrophages, tels qu'ils seront utilisés dans les chapitres suivants. Parmi les informations obtenues, il sera particulièrement intéressant d'apprécier la répartition des AGPI en C20 à l'origine de la production des différents types d'eicosanoïdes intervenant dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. L'autre objectif de ce travail est d'établir la même

cartographie pour les lignées cellulaires J774 et THP1. Ceci permettra d'établir les différences et les similitudes du lipidome entre ces trois types cellulaires. L'idée serait de fournir des arguments objectifs pour savoir si, selon l'hypothèse métabolique à explorer, il est possible de substituer dans les études à réaliser les HMDM par une autre lignée comparable.

Ainsi, ce chapitre comporte plusieurs parties avec l'utilisation de deux techniques analytiques. La première est la chromatographie en phase gazeuse des acides gras méthylés, dont nous présenterons les différentes étapes de transposition de la méthode au sein du service d'analyses des médicaments et métabolites et le traitement des données obtenues lors des analyses par chromatographie liquide à polarité de phases normale couplé à un détecteur à aérosol chargé et un spectromètre ultra-haute résolution hybride, le LTQ-Orbitrap™.

## **2 Matériel et méthodes**

### **2.1 Culture cellulaire**

Les monocytes humains ont été isolés à partir de sang total issu de 4 donneurs normolipidiques (Etablissement français du sang, EFS) par gradient de Ficoll et différenciés en macrophages par adhésion sur support plastique Primaria® 24 puits pendant une période de 11 jours dans un milieu de culture composé de RPMI 1640 auquel est ajouté 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), des antibiotiques et 20 ng/mL de hM-CSF (human macrophage-colony stimulating factor).

Les lignées de THP1 et de J774 ont été cultivées dans un milieu de culture standard (RPMI 1640 avec glutamine, pénicilline-streptomycine et 10 % SVF identique à celui utilisé pour les HMDM dont la composition en AG est indiqué Tableau 8. Les cellules ont été incubées à 37 °C et dans une atmosphère avec 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à atteindre 80-90 % de confluence.

Acides gras	Proportion relative
C14:0	1,1
C16:0	21,6
C16:1	2,9
C18:0	17,3
C18:1	28,2
C18:2	5,6
C20:1	0,3
C20:2	3,2
C20:4	7,8
C20:5	2,2
C22:4	0,5
C22:5	4,5
C22:6	4,8

Tableau 8 : Proportions relatives des acides gras contenus dans le sérum de veau fœtal utilisé dans les cultures cellulaires

## 2.2 Produits chimiques

### 2.2.1 Standards

Les standards de phospholipides (PL) qui ont été utilisés pour les analyses LC-MS proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) : diphosphatidylglycérol ou cardiolipine (CL), glycérophosphatidylinositol (PI) (extrait de foie de bovin), L- $\alpha$ -glycérophosphatidyléthanolamine (PE), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC), L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine (LPC) (extrait de jaune d'œuf), L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-sérine (PS) et sphingomyéline (SM) (extrait de cerveau de bovin). Les standards ont été préparés à la concentration initiale de 0,5 g.L<sup>-1</sup> dans un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1 ; v/v). Tous les analytes ont été conservés à une température de -20 °C.

L'huile Lipowheat<sup>®</sup> est une huile alimentaire obtenue à partir d'extraction du blé fournie par ROBERTET Health & Beauty (Vannes, France). Cette huile végétale a été utilisée pour valider au préalable la méthodologie de séparation des différentes catégories de lipides d'un échantillon. Pour les analyses GC-MS, un mélange de 37 AG méthylés Supelco<sup>®</sup> et du méthyle nonadécanoate ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

### 2.2.2 Solvants

Les solvants utilisés pour les extractions et les analyses chromatographiques sont le *n*-heptane, le 2-propanol, le chloroforme et le méthanol. Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC obtenus chez VWR international, la triéthylamine (99 %) et de l'acide acétique glacial ont été ajoutés dans toutes les phases mobiles (Sigma Aldrich®).

## **2.3 Extraction des lipides et préparation des acides gras méthylés**

L'extraction des lipides a été réalisée en utilisant une méthode dérivée de la méthode de Folch<sup>40</sup>. Les extraits lipidiques ont été recueillis dans la phase chloroformique après une centrifugation à 1 000 g pendant 10 minutes à température ambiante. Les résidus lipidiques ont été évaporés à sec puis reconstitués dans 300 µL d'un mélange chloroforme/méthanol (2 :1 ; v/v). La population d'échantillons analysée est constituée de 4 échantillons par type de macrophages.

Pour les analyses GC-MS, seule la fraction phospholipidique a été étudiée. Une colonne de 100 mg de phase aminopropyle (Agilent Technologies®) a été utilisée pour réaliser le fractionnement des différentes catégories de lipides.

## **2.4 Analyses GC/MS des acides gras méthylés**

Les analyses GC/MS ont été effectuées sur Trace GC Ultra gas chromatography équipé d'un injecteur automatique AI3000II couplé avec une trappe ionique ITQ 900 fourni par Thermofisher Scientific (Les Ulis, France). La séparation de chromatographie en phase gazeuse a utilisé une colonne TraceGold TG-polar (longueur 30 m x ID 0,25 mm x film thickness 0,2 µm). Il s'est agi de transposer une méthode d'analyse des AG méthylés sur l'équipement du Service d'Analyses des Médicaments et Métabolites (SAMM).

## **2.5 Analyses des phospholipides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)**

### **2.5.1 Chromatographie liquide et analyse quantitative des classes lipidiques**

La séparation des PL a été effectuée à une température de 35 °C en utilisant une colonne PVA-Sil (150 x 2,1 mm ID, 120A) YMC Europe GmbH. Le débit des effluents chromatographiques a été fixé à 0,25 mL.min<sup>-1</sup> au détecteur Corona (Thermo-Fischer Scientific<sup>®</sup>, Les Ulis France) pour les analyses quantitatives. De l'éthanol a été mélangé aux effluents chromatographiques à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> fourni par une seconde pompe chromatographique. Une série de contrôles a été analysée pour la quantification des classes lipidiques diluées dans les mêmes conditions que les échantillons biologiques. Ces échantillons ont été dilués pour obtenir des concentrations de 0,0125 à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. La quantification des classes phospholipidiques a été réalisée sur 8 déterminations pour chaque type de macrophages.

## 2.5.2 Spectrométrie de masse

Les effluents chromatographiques sont introduits dans le spectromètre LTQ-Orbitrap Velos Pro<sup>™</sup>, ThermoFischer Scientific<sup>®</sup> (Les Ulis, France) à un débit de 0,15 mL.min<sup>-1</sup> équipé d'une source Electrospray. Le mode d'ionisation négative a été utilisé pour obtenir des informations structurales sur les espèces moléculaires. Le balayage Full-Scan a été effectué de  $m/z$  300 à 1 800 par la cellule Orbitrap<sup>™</sup> avec une résolution de 100 000. Simultanément, les fragmentations MS<sup>2</sup>/MS<sup>3</sup> ont été réalisées dans la double trappe linéaire à basse résolution avec une énergie de collision de 35 unités arbitraires. Les PL ont été identifiés quel que soit leur niveau d'intensité du moment que les données de spectrométrie de masse MS<sup>2</sup> ou MS<sup>3</sup> permettent l'identification des espèces moléculaires.

## 3 Résultats

### 3.1 Analyses GC-MS de la composition des phospholipides membranaires

#### 3.1.1 Evaluation de l'extraction en phase solide des phospholipides

Les échantillons obtenus après extraction en phase liquide, inspirée du protocole de Folch, sont des extraits de lipides totaux<sup>40</sup>. L'objectif est d'étudier la composition des PL membranaires de différents types de macrophages, notamment avec une méthode de GC-MS. Elle nécessite une étape préalable d'hydrolyse des PL natifs. La *trans*-estérification étant une réaction non spécifique, il est donc nécessaire de séparer les PL des autres classes lipidiques avant hydrolyse.

Pour effectuer la purification de la fraction phospholipidique, la technique choisie est l'extraction en phase solide. Différentes colonnes peuvent être utilisées comme les supports constitués de silice vierge. Le chloroforme permet l'élution des lipides neutres et le méthanol, l'élution des PL<sup>55</sup>. Cette technique présente l'avantage d'être rapide puisqu'elle comporte uniquement deux étapes. D'autres méthodes ont été développées avec des supports à base de silice comprenant des greffons aminopropyles, comme celle développée par Kaluzny<sup>57</sup>. Quels que soient les supports, le principal critère de performance des méthodes SPE est de minimiser la présence de coélution au sein des différentes fractions. Elles peuvent conduire à rendre des proportions d'AG surestimées.

Il est important de pouvoir disposer de méthodes d'analyse des différentes fractions afin d'évaluer la présence éventuelle de coélutions. De nombreuses études ont cherché à améliorer la qualité de la séparation des différentes classes lipidiques en se basant sur le travail de Kaluzny<sup>54,57,308-310</sup>. Les techniques de contrôle sont principalement la chromatographie liquide sur couche mince (CCM), la GC-MS ou la LC. Il serait même envisageable d'évaluer la composition des différentes fractions par des techniques LC-MS afin de déterminer la composition en espèces moléculaires des différentes fractions.

La purification des PL a ici été effectuée sur colonne aminopropyle 100 mg. Les protocoles de Kaluzny<sup>57</sup> et de Pinkart<sup>311</sup> ont déjà été comparés dans les travaux de Ruiz *et al*<sup>312</sup> à l'aide de méthodes de CCM et de GC. Ils ont montré que la méthode de Pinkart conduit à une fraction phospholipidique présentant peu de coélutions avec les lipides neutres et les AG libres.

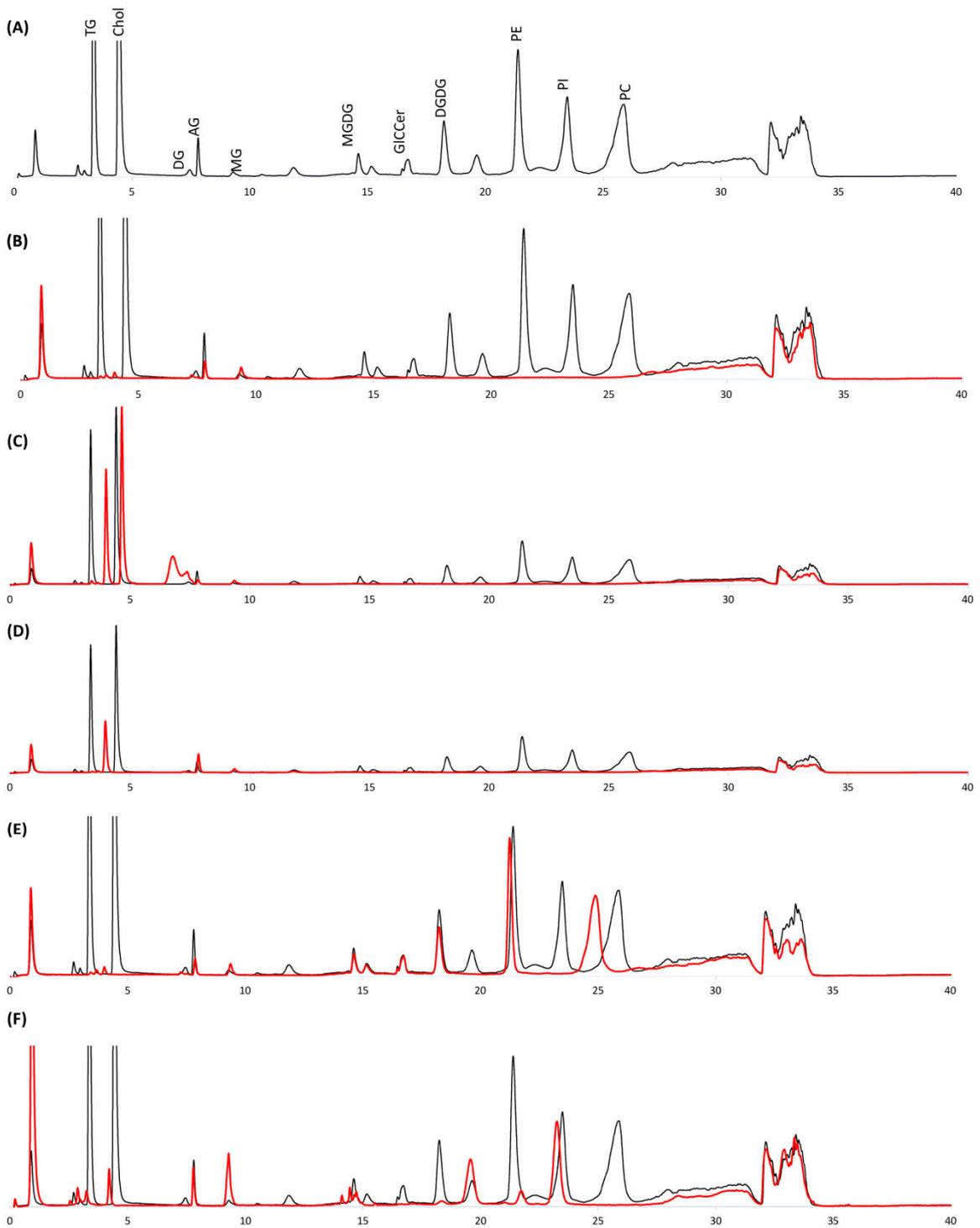
Ce protocole a été testé en utilisant une méthode NP-LC récemment publiée<sup>288</sup> permettant la séparation de différentes classes lipidiques allant des triglycérides jusqu'aux PL. L'objectif est de valider le protocole de SPE et la vitesse de passage des différentes phases. Un mélange type destiné à mimer la complexité d'un échantillon biologique a été constitué à partir d'huile végétale, de lécithine de soja et de cholestérol. Les différentes concentrations en mélange sont les suivantes : 0,5 g.L<sup>-1</sup> d'huile végétale, 1,5 g.L<sup>-1</sup> de lécithine de soja et de 0,25 g.L<sup>-1</sup> de cholestérol, pour un volume total de 500 µL. Un prélèvement d'un aliquot de 50 µL est effectué pour analyse (Figure 44 (A)). Le volume résiduel (450 µL) est évaporé sous flux d'azote et repris dans 100 µL d'un mélange *n*-heptane/chloroforme/méthanol (95:3:2 ; v/v) pour effectuer le dépôt. En plus du solvant d'activation effectué par 3 mL de *n*-heptane, le Tableau 9 indique la composition des différentes phases, le volume d'élution des solvants et les résultats attendus en termes de classes lipidiques récupérées. Chaque fraction a été évaporée sous flux d'azote et reprise avec un volume de chloroforme de 450 µL puis analysée. Le percolât a aussi été analysé afin d'évaluer les capacités de rétention de la colonne. Les différents chromatogrammes obtenues sont représentés Figure 44.

Solvants		Fractions lipidiques supposées être extraites
Fraction 1	2,5 mL de chloroforme	Lipides neutres
Fraction 2	2,5 mL de diéthyléther/acide acétique (98 : 2; v/v)	Acides gras libres
Fraction 3	2,5mL de méthanol / chloroforme (6 : 1; v/v)	Phospholipides
Fraction 4	2,5mL de méthanol / chloroforme (6 : 1; v/v) avec 0,05mol.L <sup>-1</sup> d'acétate de sodium	Phospholipides

**Tableau 9 : Protocole utilisé lors de l'évaluation de la méthode de purification de phospholipides**

Le chromatogramme représenté Figure 44 (A) montre qu'il existe trois zones d'éluion. La première correspond à l'éluion des lipides neutres comme les glycérolipides et le cholestérol. La deuxième partie correspond aux glycolipides et la troisième à l'éluion des PL. Le chromatogramme du percolât montre que la quantité de matière déposée est en adéquation avec la capacité de rétention de la colonne (Figure 44 (B)).

La Figure 44 (C) correspond au chromatogramme de la fraction chloroformique. Elle est constituée de glycérolipides, de cholestérol et de composés correspondant au temps de rétention des AG libres. Par ailleurs, le chromatogramme de la fraction 2, Figure 44 (D) indique la présence de triglycérides et d'AG libres. Enfin, le mélange méthanol/chloroforme (6 :1; v/v) est constitué des pics de PC et PE tandis que la phase méthanol/chloroforme (6 :1; v/v) avec 0,05 mol.L<sup>-1</sup> d'acétate de sodium permet l'éluion des PI, Figure 44 (E et F). L'aire des pics des PL récupérés par SPE sont superposables aux pics de la solution mère. Les interférences des fractions phospholipidiques correspondent à la présence de glycolipides.



TG : triglycérides, Chol : cholestérol, DG: diacylglycérols, AG: acides gras libres, MG: monoacylglycérols, MGDG: monogalactosyldiglycérols, GlcCer : glycosylcéramides, DGDG : digalactosyldiglycérols

Figure 44 : Chromatogrammes obtenus après analyse des différentes fractions ; (A) solution mère, (B) percolât, (C) fraction obtenue après élution du volume de chloroforme, (D) fraction obtenue après élution de la phase diéthyléther/acide acétique (98 : 2; v/v), (E) fraction obtenue après élution de la phase chloroforme/ méthanol (6 : 1; v/v) et (F) fraction obtenue après élution de la phase chloroforme/ méthanol (6 : 1; v/v) avec 0,05mol.L<sup>-1</sup> d'acétate de sodium

A partir de ces résultats, le protocole suivant a été défini pour la préparation des échantillons biologiques. La colonne aminopropyle a été activée par 4 mL de *n*-heptane puis un volume d'échantillon de 100 µL a été déposé. Les lipides neutres ont été élués par 3 mL de chloroforme, la fraction AG libre a été éluée par 4 mL de diéthyl éther/acide acétique (98 :2 ; v/v). Ces volumes ont été augmentés par rapport au protocole initial. Enfin, les PL ont été élués avec 3 mL de méthanol/chloroforme (6 :1 ; v/v) puis avec 3 mL de méthanol/chloroforme (6 :1 ; v/v) contenant 0,05 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate de sodium. Les différents essais réalisés ont montré qu'il est nécessaire d'avoir un débit de phase mobile correspondant à du goutte à goutte. Ainsi, aucun vide n'a été appliqué durant l'extraction. Les deux dernières fractions ont été collectées, réunies et évaporées à sec puis reprises dans 1,6 mL de méthanol pour procéder à la *trans*-estérification.

### **3.1.2 Développement de la méthode de chromatographie en phase gazeuse des acides gras méthylés**

La consultation des bases de données comme LipidWeb<sup>313</sup> ou LipidMaps<sup>314</sup> montre que l'analyse des AG méthylés est particulièrement complexe. En effet, on dénombre plus de 1000 structures référencées qui diffèrent tant par leur longueur de chaîne que par le nombre, la position et les isoméries des insaturations. Les AG sont communément analysés par des méthodes de chromatographie en phase gazeuse sous forme d'AG méthylés. Le couplage de la GC avec la spectrométrie de masse informe à la fois sur les temps de rétention et la masse molaire des composés. Par ailleurs, l'analyse des dérivés méthylés en spectrométrie de masse n'est pas forcément adaptée à la détermination de la position des insaturations. D'autres méthodes que la méthylation sont plus adaptées. Il s'agit de greffer sur la fonction acide carboxylique, un composé contenant un atome d'azote. En spectrométrie de masse, la charge de la molécule est portée par un atome d'azote et non par l'AG. Cette stratégie permet de limiter l'ionisation ou les migrations des doubles liaisons. Trois principaux agents de dérivatisation sont communément utilisés : les dérivés 3-pyridylcarbinol, 4,4-diméthylloxazoline et les dérivés acyl-pyrrolidines<sup>64,315</sup> (Figure 45).

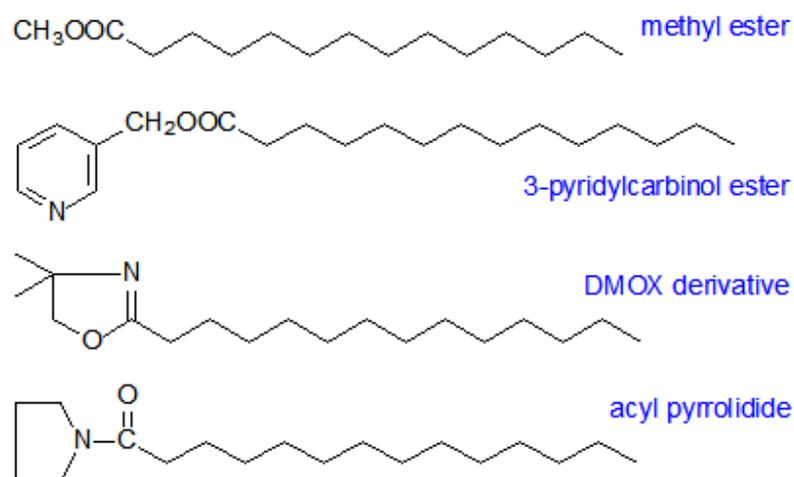


Figure 45 : Les agents de dérivation pour l'analyse des acides gras en chromatographie en phase gazeuse<sup>316</sup>

L'objectif est de transposer une méthode d'analyse des AG méthylés afin de déterminer les proportions relatives des AG des PL membranaires des différents types de macrophages utilisés dans le cadre de la thématique de l'équipe de biologie. Ces données seront comparées aux macrophages ayant subi des modifications membranaires lors de l'ajout d'AG dans le milieu de culture dans le chapitre suivant. L'information sur la position des insaturations n'est pas ici une donnée recherchée.

Pour effectuer cette transposition, on peut envisager d'obtenir chaque standard d'AG méthylés pour effectuer le développement et la validation de la méthode. L'avantage est d'offrir la possibilité de fabriquer ses propres mélanges, d'enregistrer les spectres de masse pour chaque espèce comme spectre de référence et de procéder à une validation de la méthode selon les critères ICH. Néanmoins, cela est difficile à mettre en œuvre du fait du nombre de références, de la nécessité d'utiliser des étalons internes pour chaque molécule et du temps de préparation et d'analyse des échantillons. L'alternative choisie a été d'étudier un mélange commercial d'AG méthylés.

Le FAME 37 Supelco<sup>®</sup> est un mélange de 37 AG méthylés, présenté sous forme d'une solution de 1 mL solubilisée dans du dichlorométhane. La composition de ce mélange, les pourcentages en masse de chaque AG méthylé et les abréviations utilisées pour chaque espèce, sont indiqués dans le Tableau 10. La concentration nominale du standard est de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  et la concentration de chaque composé s'échelonne entre 200 et  $600 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Qualitativement, ce mélange peut être considéré, en première approche, comme représentatif d'un mélange biologique. En effet, sa composition et les résultats obtenus par l'équipe de biologie sont qualitativement proches<sup>275,282</sup>. Cependant le dérivé méthylé de l'acide docosapentaénoïque (C22:5) ou DPA n'est pas présent dans le standard. Par ailleurs, certains AG méthylés sont présents dans le standard alors que ces espèces sont minoritaires dans un échantillon biologique (AG méthylés impairs ou à chaîne courte).

Acides gras méthylés	Abréviations	Concentration (% masse)	Masse
<b>Acide gras pairs méthylés saturés</b>			
Méthyle butanoate	<b>C4:0</b>	4	102,13
Méthyle hexanoate	<b>C6:0</b>	4	130,18
Méthyle octanoate	<b>C8:0</b>	4	158,24
Méthyle decanoate	<b>C10:0</b>	4	186,29
Méthyle dodecanoate	<b>C12:0</b>	4	214,34
Méthyle tétradécanoate	<b>C14:0</b>	4	242,40
Méthyle hexadécanoate	<b>C16:0</b>	6	270,45
Méthyle octadécanoate	<b>C18:0</b>	4	298,50
Méthyle eicosanoate	<b>C20:0</b>	4	326,56
Méthyle docosanoate	<b>C22:0</b>	4	354,61
Méthyle tétracosanoate	<b>C24:0</b>	4	382,66
<b>Acides gras pairs méthylés monoinsaturés</b>			
Méthyle-9Z-tétradécénoate	<b>C14:1</b>	2	240,38
Méthyle-9E-palmitoléate	<b>C16:1</b>	2	268,43
Méthyle-9E-octadécénoate	<b>C18:1t</b>	2	296,49
Méthyle-9Z-octadécénoate	<b>C18:1c</b>	4	296,49
Méthyle-11E-eicosénoate	<b>C20:1</b>	2	324,54
Méthyle-13Z-docosénoate	<b>C22:1</b>	2	352,59
Méthyle-15Z-tétracosénoate	<b>C24:1</b>	2	380,65
<b>Acides gras impairs méthylés saturés</b>			
Méthyle undécanoate	<b>C11:0</b>	2	200,32
Méthyle tridécanoate	<b>C13:0</b>	2	228,37
Méthyle pentadécanoate	<b>C15:0</b>	2	256,42
Méthyle heptadécanoate	<b>C17:0</b>	2	284,48
Méthyle hénéicosanoate	<b>C21:0</b>	2	340,58
Méthyle tricosanoate	<b>C23:0</b>	2	368,64
<b>Acides gras impairs méthylés monoinsaturés</b>			
Méthyle-10Z-pentadécénoate	<b>C15:1</b>	2	254,41
Méthyle-10Z-heptadécénoate	<b>C17:1</b>	2	282,46
<b>Acides gras pairs méthylés polyinsaturés</b>			
Méthyle-9Z-12Z-octadécadiénoate	<b>C18:2 c</b>	2	294,47
Méthyle-9E-12E-octadécadiénoate	<b>C18:2 t</b>	2	294,47
Méthyle-6Z-9Z-12Z-octadecatrénoate	<b>C18:3γ</b>	2	292,46
Méthyle-9Z-12Z-15Z-octadécatriénoate	<b>C18:3α</b>	2	292,46
Méthyle-11Z-14Z-eicosadiénoate	<b>C20:2</b>	2	322,53
Méthyle-8Z-11Z-14Z-eicosatriénoate	<b>C20:3 n6</b>	2	320,51
Méthyle-11Z-14Z-17Z-eicosatriénoate	<b>C20:3 n3</b>	2	320,51
Méthyle-5Z-8Z-11Z-14Z-eicosatétranoate	<b>C20:4</b>	2	318,49
Méthyle-5Z-8Z-11Z-14Z-17Z-eicosapentaénoate	<b>C20:5</b>	2	316,48
Méthyle-13Z-16Z-docosadiénoate	<b>C22:2</b>	2	350,58
Méthyle-4Z-7Z-10Z-13Z-16Z-19Z-docosahexaénoate	<b>C22:6</b>	2	342,51

Tableau 10 : Composition du standard d'acides gras méthylés (FAME 37 Supelco®) abrégations utilisées, et masse des acides gras méthylés

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour analyser les AG méthylés nécessite de connaître l'ionisation et la fragmentation des AG méthylés. La source d'ionisation la plus couramment utilisée est l'impact électronique. Elle conduit à un spectre de masse riche en ions, constitué de nombreux fragments.

L'observation du spectre de masse de l'acide palmitique méthylé montre la présence de l'ion moléculaire ( $m/z$  270). Les ions signatures d'un ester méthylique sont  $m/z$  239 et  $m/z$  74. Par ailleurs, on observe une série d'ions apparentée avec un écart  $m/z$  14 ( $m/z$  : 87 ; 101 ; 115 ; 129 ; 143 ; 157 ; 171 ; 185 ; 199). Ce motif de fragmentation est caractéristique des AG méthylés saturés (Figure 46).

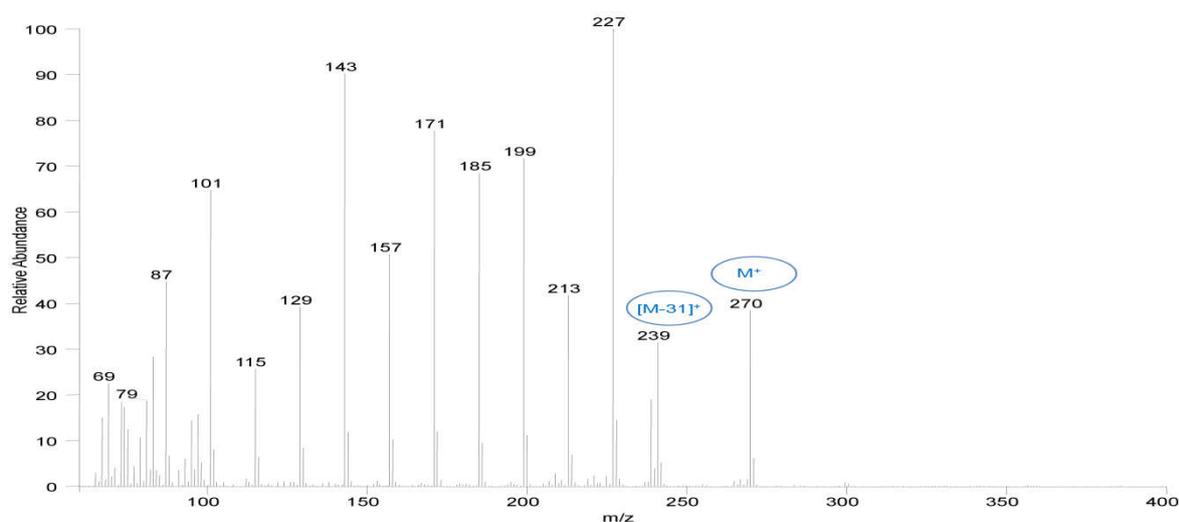


Figure 46 : Spectre de masse du méthyle palmitate obtenu après impact électronique

Pour les dérivés monoinsaturés, certains fragments sont communs aux spectres des dérivés saturés, comme la présence de l'ion moléculaire, des fragments  $[M-31]^+$  et  $m/z$  74. Cependant, l'identification de ces espèces est réalisée en comparant les données obtenues avec les dérivés saturés (temps de rétention,  $m/z$  de l'ion moléculaire). L'information concernant la position de l'insaturation n'est pas accessible (Figure 47).

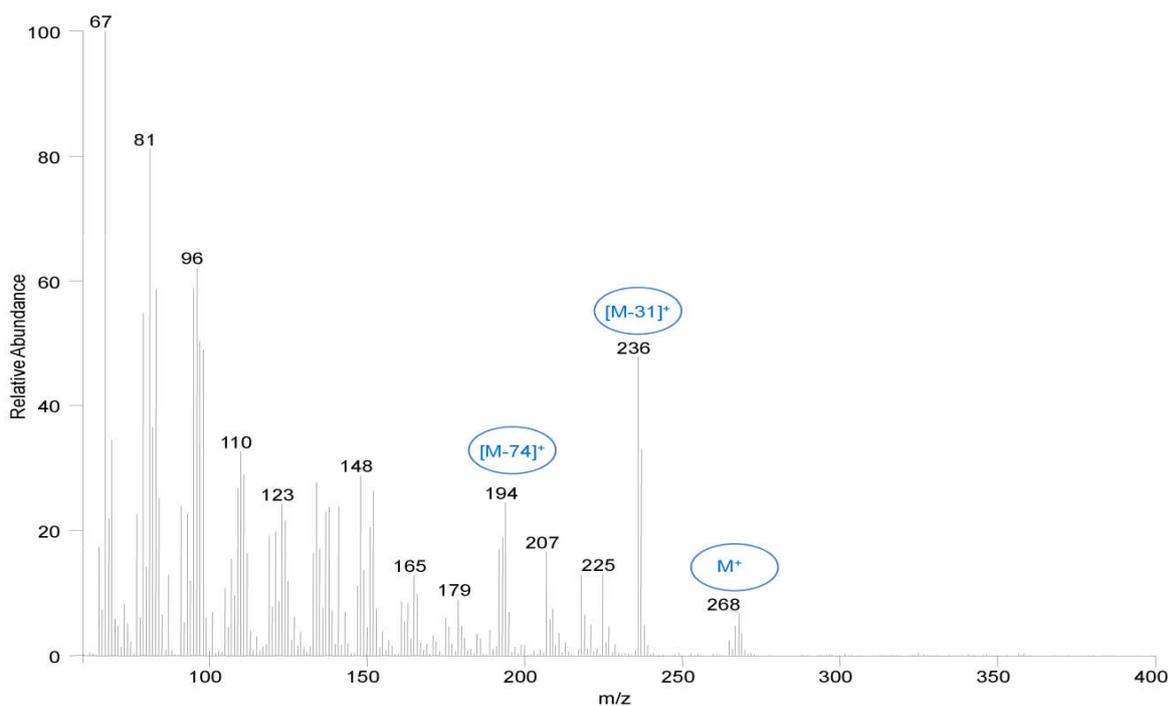
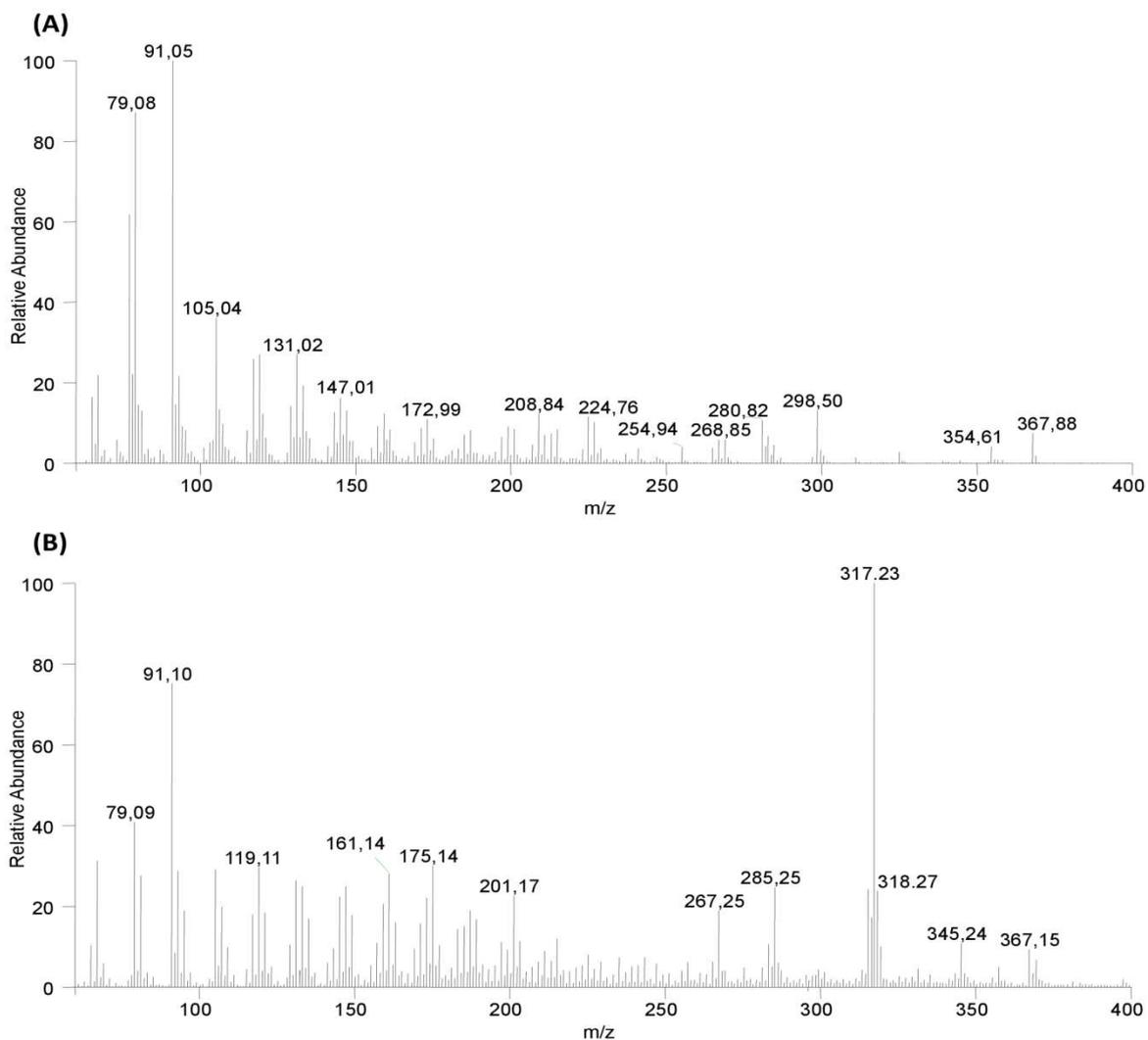


Figure 47 : Spectre de masse du méthyle palmitoleate obtenu après impact électronique

Pour les dérivés polyinsaturés, les spectres de masse sont particulièrement difficiles à interpréter. En effet, l'ion moléculaire est de plus en plus difficile à observer au fur et à mesure que le nombre d'insaturations augmente. De plus, les spectres sont beaucoup plus bruités par rapport aux dérivés complètement saturés. Ce phénomène est particulièrement gênant lorsque les dérivés d'AG présentent plus de 5 insaturations<sup>64,262,263,317</sup>.

L'objectif est de fournir les informations nécessaires afin de confirmer la classe de la molécule et sa masse. Dans ces conditions, la méthode d'ionisation ne s'est pas orientée vers l'impact électronique. L'ionisation chimique permet d'effectuer une ionisation plus adaptée pour caractériser les AG méthylés polyinsaturés. Le gaz réactant est le méthane.

La Figure 48 compare les spectres de masse obtenus après ionisation chimique et impact électronique du dérivé méthylé de l'EPA (C20:5). La Figure 48 (B) montre les ions  $[M-H]^+$  ( $m/z$  317) et  $[M-32]$  ( $m/z$  285) ainsi que  $[M+C_2H_5]^+$  et  $[M-C_3H_5]^+$  respectivement  $m/z$  345 et 367<sup>318</sup>. Ainsi, l'identification des dérivés d'AG polyinsaturés est facilitée avec l'ionisation chimique. Le spectre obtenu par impact électronique montre que l'ion moléculaire n'est pas visible (Figure 48 (A)). L'utilisation de l'ionisation chimique a été profitable pour identifier les coélutions durant le développement de la méthode.



**Figure 48 : Spectre de masse d'un acide gras polyinsaturé (C20:5) obtenu en impact électronique (A) et en ionisation chimique utilisant le méthane comme gaz réactant (B)**

La première phase de développement consiste à explorer la qualité de la séparation des AG méthylés et d'identifier les espèces coéluées. Le programme du four de la méthode 1 (Figure 49 (1)) a pour objectif de balayer l'ensemble de la gamme de températures. La température initiale est de 40°C et augmente jusqu'à 175 °C à raison de 6 °C.min<sup>-1</sup>, puis augmente à 250 °C à raison de 8 °C.min<sup>-1</sup>. Cette température finale est maintenue 5 minutes.

On observe que le premier AG méthylé à être élué est le C8:0 au temps de rétention de 8 minutes. La température correspondante du four est de 88 °C. L'identification de l'ensemble des composés montre que la séparation est particulièrement efficace et résolutive. En effet, les dérivés d'AG saturés et monoinsaturés possèdent des temps de rétention qui permettent de distinguer ces molécules. Par ailleurs, il est possible avec ce système chromatographique de distinguer les isomères de position. En effet, les deux isomères du méthyle octadécénoate sont séparés. Il est possible de

distinguer ces isomères puisque leurs concentrations sont différentes. L'exploitation des spectres de masse a été utilisée pour identifier que les pics chromatographiques correspondent à des AG à 18 atomes de carbone avec une insaturation. Les autres isomères de position (C18:2, C18:3 et C20:3) n'ont pas pu être réalisés (même concentration dans le mélange). Deux coélutions ont été identifiées : celle avec le C20:3 avec l'ester méthylique de l'acide arachidonique (26,67 minutes) et celle avec le C23:0 et l'EPA méthylé (27,21 minutes).

Au vu de ces résultats, le programme du four a été modifié (Figure 49 (2)). La température initiale du four est cette fois de 110 °C, auquel il a été ajouté un délai de solvant de 3 minutes. En effet l'observation dans le chromatogramme des AG méthylés à chaînes courtes n'est pas souhaitée. Ainsi, la température choisie (110 °C) est proche de la température d'élution du composé du C11:0 (118°C). La deuxième rampe de température a été modifiée pour augmenter jusqu'à 175 °C à raison de 6 °C.min<sup>-1</sup> puis suivie d'une augmentation jusqu'à 185 °C à raison de 1°C.min<sup>-1</sup>. L'objectif est d'assurer la séparation des AG méthylés coélus. Enfin, une dernière rampe de gradient a été ajoutée de 185 à 210 °C à raison de 5 °C.min<sup>-1</sup>.

L'observation du chromatogramme présenté Figure 49 (2) et des temps de rétention des AG méthylés (Tableau 11), montre que l'ester méthylique de l'EPA n'est plus coélué avec le C23:0. Par contre le C20:4 et toujours coélué avec un des isomères du C20:3. Une fenêtre de détection SIM (Single Ion Monitoring) a été ajoutée au temps de rétention 17,6 minutes. Les ions suivis correspondent aux ions moléculaires et aux fragments [M-31]<sup>+</sup>.

La séparation et le temps d'analyse de cette méthode sont considérés comme satisfaisants en termes de résolution des pics chromatographiques. Afin d'utiliser cette méthode pour les échantillons biologiques une étude de la limite de détection et de la linéarité a été effectuée.

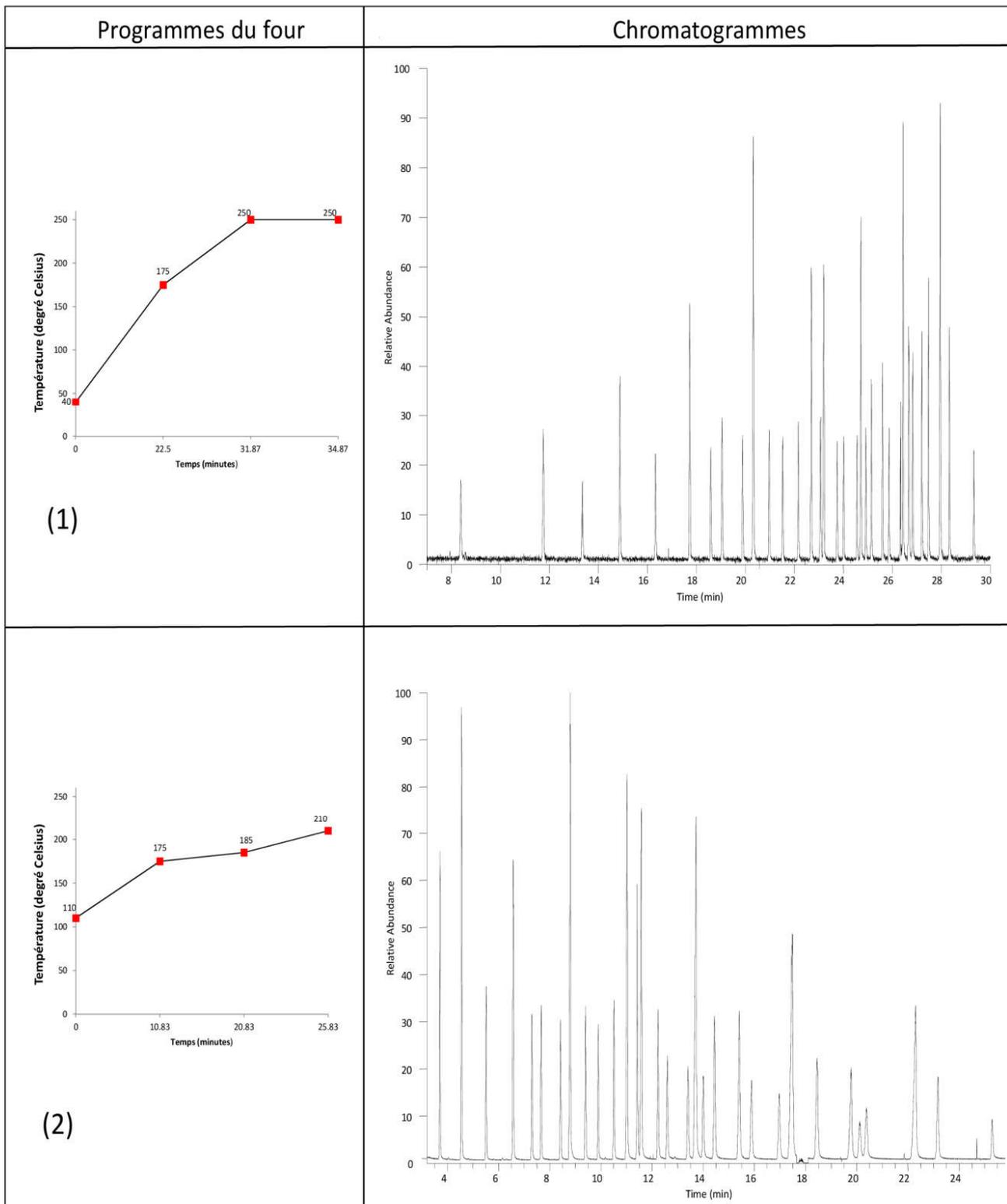


Figure 49 : Chromatogramme du FAME 37 réalisé à partir du programme du four initial (1) et de la méthode définitive (2)

Abréviations acides gras méthylés	Temps de rétention méthodes	
	1	2
C8:0	8,37	
C10:0	11,75	
C11:0	13,35	3,73
C12:0	14,88	4,57
C13:0	16,33	5,52
C14:0	17,74	6,57
C14:1	18,59	7,30
C15:0	19,05	7,66
C15:1	19,90	8,41
C16:0	20,33	8,79
C16:1	20,97	9,39
C17:0	21,53	9,88
C17:1	22,17	10,50
C18:0	22,70	11,00
C18:1 t	23,07	11,41
C18:1 c	23,20	11,55
C18:2c ou C18:2t	23,75	12,23
C18:2c ou C18:2t	24,07	12,59
C18:3γ ou C18:3α	24,54	13,40
C20:0	24,74	13,66
C18:3γ ou C18:3α	24,90	13,96
C20:1	25,15	14,4
C21:0	25,60	15,36
C20:2	25,80	15,84
C20:3 n6 ou C20:3 n3	26,34	16,93
C22:0	26,44	17,39
C20:3 n6 ou C20:3 n3	<b>26,67</b>	<b>17,80</b>
C20:4		
C22:1	26,84	18,38
C23:0		19,7
C20:5	<b>27,21</b>	20,07
C22:2	27,49	20,31
C24:0	27,96	22,22
C24:1	28,33	23,11
C22:6	29,33	25,25

Tableau 11 : Comparaison des temps de rétention des acides gras méthylés du standard FAME Supelco® obtenus à partir de deux méthodes de chromatographie en phase gazeuse

### 3.1.3 Linéarité, limite de détection, étalon interne

Deux gammes ont été réalisées avec 7 niveaux de dilution (100, 75, 50, 25, 13, 5 et 1 %). L'objectif est de déterminer la limite à partir de laquelle l'ensemble des AG méthylés sont détectables. La Figure 50 montre les chromatogrammes de l'échantillon FAME 37 dilué à 5 % (A) et celui dilué à 13 % (B). On observe que cette limite se situe pour les AG méthylés à faibles coefficients de réponse (C22:6) à partir du point de gamme à 13%. Ainsi, la linéarité de la méthode a été vérifiée sur 4 niveaux de dilution. Le Tableau 12 présente les coefficients de réponse pour une unité de masse, l'ordonnée à l'origine et la pente de la droite de régression, les coefficients de corrélation, le coefficient de variation pour chaque niveau.

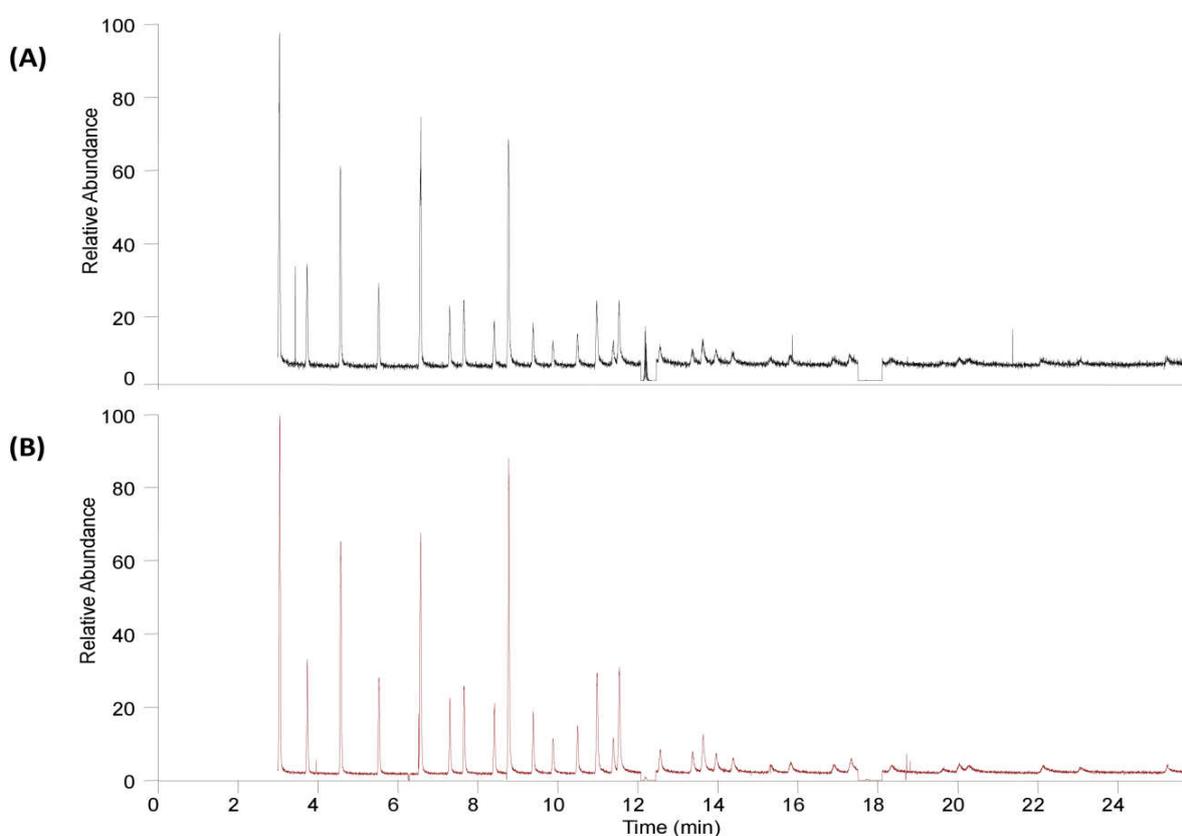


Figure 50 : Chromatogrammes du FAME 37 après dilution à 5 % (A) et 13 % (B)

On observe que l'ensemble des coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,8 et que la qualité de l'ajustement varie en fonction des AG méthylés. Les erreurs expérimentales durant la fabrication des gammes peuvent expliquer les valeurs des coefficients de corrélation (faible volume de prélèvement, solvant de dilution volatil). Par ailleurs, la répétabilité pour les trois points de gamme les plus concentrés (100, 75 et 50 %) est inférieure à 15 %. Pour le point le plus dilué, cette répétabilité se situe dans la limite des 20 % pour tous les AG méthylés sauf pour le C23:0.

Abréviation FAME	Facteur de réponse	Fonction réponse linéaire Y = AX+B			CV répétabilité (%)			
		A	B	R	25	50	75	100
C11:0	8139	1.41E+04	-2.06E+05	0,961	5,57	2,98	9,37	1,09
C12:0	7034	2.11E+04	-2.84E+05	0,945	5,69	2,20	8,42	1,14
C13:0	6756	9.49E+03	-1.48E+05	0,941	14,23	4,01	6,33	1,20
C14:0	6493	1.95E+04	-2.84E+05	0,933	8,94	3,72	7,61	0,85
C14:1	6423	9.84E+03	-1.64E+05	0,909	11,91	3,29	6,80	0,89
C15:0	6784	1.07E+04	-1.81E+05	0,931	7,11	11,21	8,63	0,93
C15:1	6541	1.02E+04	-1.91E+05	0,918	8,31	7,35	10,92	3,55
C16:0	7253	3.96E+04	-6.301E+05	0,944	12,01	1,12	8,83	0,08
C16:1	6864	1.14E+04	-2.182E+05	0,918	11,46	7,21	11,94	1,47
C17:0	5888	1.06E+04	-2.110E+05	0,907	13,52	6,31	2,10	0,55
C17:1	7181	1.26E+04	-2.551E+05	0,916	17,61	6,95	5,94	0,84
C18:0	8703	3.82E+04	-7.189E+05	0,944	5,54	2,45	11,13	0,21
C18:1t	7930	1.48E+04	-3.132E+05	0,922	15,48	6,93	16,83	0,33
C18:1c	5285	3.54E+04	-7.000E+05	0,939	6,39	1,26	9,83	0,63
C18:2c ou C18:2t	6583	1.39E+04	-2.073E+05	0,910	7,39	10,53	15,48	0,65
C18:2c ou C18:2t	6081	1.08E+04	-2.294E+05	0,928	4,84	4,24	11,98	1,11
C18:3γ ou C18:3α	6269	1.03E+04	-2.282E+05	0,918	10,27	5,50	13,44	1,69
C20:0	11158	4.99E+04	-1.049E+06	0,946	3,18	3,11	10,78	0,35
C18:3γ ou C18:3α	5972	1.08E+04	-2.445E+05	0,932	18,22	3,06	10,52	0,65
C20:1	9938	1.90E+04	-4.433E+05	0,923	16,23	8,73	2,37	0,24
C21:0	11869	2.12E+04	-5.089E+05	0,900	19,38	9,39	6,79	0,32
C20:2	6638	1.13E+04	-2.736E+05	0,910	14,37	8,80	3,21	1,48
C20:3 n6 ou C20:3 n3	6983	1.03E+04	-2.556E+05	0,811	13,80	4,92	12,56	1,57
C22:0	12657	4.70E+04	-1.109E+06	0,916	16,39	6,30	4,40	0,03
C20:3 n6 ou C20:3 n3	800	7.42E+02	-8.088E+03	0,957	17,33	12,20	9,54	3,30
C20:4	476	1.36E+03	-1.112E+04	0,915	14,12	10,81	4,53	2,96
C22:1	11309	1.72E+04	-4.360E+05	0,881	15,18	6,76	3,53	0,62
C23:0	12191	1.59E+04	-4.110E+05	0,840	21,72	8,82	9,27	0,87
C20:5	4662	6.50E+03	-1.571E+05	0,906	18,38	8,81	6,68	0,27
C22:2	6586	9.15E+03	-2.388E+05	0,882	16,28	6,12	5,60	2,09
C24:0	11520	3.33E+04	-8.273E+05	0,862	18,25	4,58	14,51	0,64
C24:1	11380	1.24E+04	-3.270E+05	0,840	19,72	19,20	3,17	0,05
C22:6	5285	6.31E+03	-1.526E+05	0,873	7,82	7,15	7,87	0,59

Tableau 12 : Linéarité et répétabilité de la méthode de séparation des acides gras méthylés

### 3.1.4 Synthèse des acides gras méthylés pour les échantillons biologiques et traitement des données

La méthylation en ester méthylique des AG est effectuée afin de diminuer la température d'ébullition des AG. Pour ce faire, les lipides natifs sont hydrolysés en AG par saponification avec de l'hydroxyde de sodium ou de potassium puis un agent de méthylation, principalement du trifluorure de bore avec du méthanol, est utilisé. La réaction de *trans*-estérification est reconnue pour être beaucoup plus rapide ; ainsi l'hydrolyse et l'estérification sont réalisées en une seule étape<sup>65,317,319</sup>.

Deux types de *trans*-estérification existent et se distinguent principalement par la nature des réactifs. Ainsi, il existe les méthodes dites basiques utilisant principalement du méthanoate de sodium et de la soude dans des conditions anhydres. Ces méthodes peuvent se dérouler à température ambiante mais ne sont pas adaptées pour les AG libres et sphingolipides. Les méthodes acides quant à elles utilisent principalement du trifluorure de bore ou de l'acide sulfurique ou chlorhydrique dans du méthanol. Les méthodes acides nécessitent de travailler à une température comprise entre 30 et 120 °C. La température de la réaction dépend de la classe lipidique et de la méthode de *trans*-estérification<sup>320,321</sup>.

Ainsi, pour la méthylation des PL membranaires, il a été utilisé du chlorure d'acétyle comme source d'acide chlorhydrique et du méthanol<sup>68,322</sup>. La fraction phospholipidique a été reprise dans 1,6 mL de méthanol avec 100 µL de chlorure d'acétyle. Ce mélange a été porté à 80 °C pendant 25 minutes. Les AG méthylés ont été recueillis à température ambiante par 2 mL de *n*-heptane évaporés à sec sous flux d'azote et repris dans 50 µL de *n*-heptane

Pour l'analyse des échantillons biologiques, les coefficients de réponse sont calculés à partir de 3 injections consécutives du FAME 37 (100 %) en début et fin de séquences. L'utilisation d'un étalon interne a été envisagée à partir d'un standard de méthyle nonadécanoate, (C19:0). Les essais préliminaires ont montré que le C19:0 est coélué avec un des deux isomères du C18:2. L'analyse d'échantillons biologiques a montré que cet isomère n'était pas présent : ainsi la quantité d'étalon interne ajouté est de 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Le calcul des proportions consiste dans un premier temps à identifier l'ensemble des AG méthylés contenus dans l'échantillon. Puis, l'aire obtenue de chaque pic chromatographique est divisée par les facteurs de réponse correspondants. La somme des ratios permet de rapporter chaque AG à un pourcentage. En effet la GC-MS est plutôt utilisée pour effectuer des analyses qualitatives tandis que la quantification des AG méthylés est plutôt effectuée en couplant la GC à un détecteur à ionisation de flamme<sup>323</sup>.

Au regard des observations précédentes la méthode suivante a été utilisée.

Pour les analyses GC-MS, seule la fraction phospholipidique a été étudiée. Une méthode d'extraction en phase solide a été utilisée basée sur la méthode de Pinkart *et al*<sup>57,311</sup>. Une colonne de 100 mg de phase aminopropyle (Agilent Technologies®, Les Ulis, France) a été activée par 4 mL de *n*-heptane puis un volume d'échantillon de 100 µL a été déposé. Les lipides neutres ont été élués par 3 mL de chloroforme, la fraction des AG libres a été éluée par 4 mL de diéthyléther/acide acétique (98 :2 ; v/v). Enfin, les PL ont été élués par 3 mL de méthanol/chloroforme (6 :1 ; v/v) puis par 3 mL de méthanol/chloroforme (6 :1 ; v/v) contenant 0,05 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate de sodium. Les deux dernières fractions ont été collectées, réunies et évaporées à sec. Cinquante µg de méthyle nonadécanoate ont été ajoutés comme étalon interne. La *trans*-estérification a été effectuée par un mélange de 1,6 mL de méthanol et 100 µL de chlorure d'acétyl pendant 25 minutes à 80°C. Après réaction, les AG méthylés ont été extraits par 2 mL de *n*-heptane, évaporés à sec puis repris dans 50 µL de *n*-heptane.

Les analyses GC/MS ont été effectuées sur Trace GC Ultra gas chromatography équipé d'un injecteur automatique AI3000II couplé avec une trappe ionique ITQ 900 fourni par ThermoFisher Scientific® (Les Ulis, France). La séparation de chromatographie en phase gazeuse a nécessité l'utilisation d'une colonne TraceGold TG-polar (30 m x ID 0,25 mm x film d'épaisseur de 0,2 µm). L'hélium a servi de gaz vecteur avec un débit de 1,3 mL.min<sup>-1</sup>. La température de l'injecteur a été réglée à 230°C comme la ligne de transfert vers la spectrométrie de masse. Le volume d'injection de l'échantillon est de 1 µL en split (ratio 1:25) et le programme du four a été réglé comme suit: 110 °C maintenus pendant 3 minutes puis une augmentation à 175°C à 6 °C.min<sup>-1</sup>, puis à 185°C à 1 °C.min<sup>-1</sup> et pour finir à 210°C à 5 °C.min<sup>-1</sup>. Le temps d'acquisition total a été de 26 minutes.

La détection en spectrométrie de masse a été effectuée en utilisant une ionisation chimique en mode positif. La température de la source a été réglée à 200°C et le méthane a été utilisé comme gaz réactant à un débit de 1,3 mL.min<sup>-1</sup>. La détection en masse a été effectuée en mode Full-Scan avec une gamme de masse allant de *m/z* 40 à 400 avec un délai de solvant de 3 minutes. Chaque AG a été exprimé en pourcentage du total de l'aire des AG identifiés. Le calcul tient compte des facteurs de réponse de chaque AG méthylé obtenus à partir de l'analyse du mélange de 37 AG méthylés (Supelco®). Les données sont exprimées par la moyenne des pourcentages ± SEM (Standard Error of Mean) pour un AG donné. Le nombre d'analyses effectuées pour chacun des groupes est égal à 20 (n=20). Les AG ayant un pourcentage inférieur à 1 % dans les trois types cellulaires ne sont pas reportés mais sont comptabilisés dans la catégorie « autres ».

### 3.1.5 Composition des échantillons biologiques

La quantification des AG méthylés est présentée Tableau 13. La somme des AG saturés ( $\Sigma$ AGS) est comparable pour les lignées J774 et THP1. La valeur est plus faible pour les HMDM avec notamment des proportions d'acide palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) diminuées qui sont néanmoins les AG majoritaires parmi les AGS.

La somme des AG monoinsaturés ( $\Sigma$ AGMI) est plus importante pour les J774, avec une proportion d'acide palmitoléique (C16:1) augmentée par rapport aux deux autres types de macrophages. Les proportions d'acide oléique (C18:1) sont du même ordre de grandeur pour la lignée J774 et HMDM. Les THP1 présentent une proportion plus faible de C18:1. Pour les AGMI, les AG majoritaires sont les acides palmitoléiques (C16:1) et oléiques C18:1.

Enfin la somme des AG polyinsaturés ( $\Sigma$ AGPI) ainsi que l'index d'insaturation sont augmentés chez les HMDM. Les proportions d'acide arachidonique (C20:4 ou AA), d'acide eicosapentaénoïque (C20:5, EPA), d'acide docosahexaénoïque (C22:6 ou DHA) et d'acide dihomo- $\gamma$ -linoléique (C20:3 ou DGLA) sont aussi augmentées dans les macrophages en culture primaire.

Acides gras méthylés	J774	THP1	HMDM
C14:0	1,41 ± 0,11	2,38 ± 0,24	1,50 ± 0,02
C16:0	27,02 ± 1,84	30,01 ± 0,95	23,96 ± 0,41
C17:0	0,88 ± 0,30	1,14 ± 0,11	1,39 ± 0,19
C18:0	24,01 ± 3,11	23,81 ± 3,40	19,26 ± 0,13
C21:0	2,98 ± 0,23	1,83 ± 0,33	1,11 ± 0,29
C24:0	0,71 ± 0,10	0,697	1,373 ± 1,08
$\Sigma$ AGS	57,82 ± 4,26	62,49 ± 3,73	46,24 ± 2,55
C14:1	0,82 ± 0,08	1,13 ± 0,36	0,70 ± 0,42
C15:1	1,22 ± 0,10	0,90 ± 0,16	1,94 ± 0,35
C16:1	4,25 ± 0,23	2,27 ± 0,29	2,56 ± 0,16
C17:1	1,56 ± 0,30	0,94 ± 0,13	1,18 ± 0,15
C18:1	17,15 ± 0,33	13,98 ± 0,61	17,16 ± 0,22
C20:1	1,30 ± 0,33	0,79 ± 0,16	0,73 ± 0,39
C24:1	1,00 ± 0,19	0,39 ± 0,04	2,05 ± 1,48
$\Sigma$ AGMI	27,62 ± 1,26	22,57 ± 1,260	22,24 ± 1,63
C18:2	1,53 ± 0,02	2,21 ± 0,32	2,25 ± 0,19
C20:3	1,30 ± 0,09	0,92 ± 0,38	4,30 ± 0,42
C20:4	3,15 ± 0,33	1,29 ± 0,14	11,90 ± 0,51
C20:5	0,85 ± 0,23	0,92 ± 0,38	1,84 ± 0,18
C22:4	3,60 ± 1,84	1,29 ± 0,15	1,23 ± 0,38
C22:5	1,20 ± 0,19	1,30 ± 0,17	1,73 ± 0,42
C22:6	1,57 ± 0,62	2,38 ± 0,31	3,68 ± 1,7
$\Sigma$ AGPI	13,90 ± 2,42	14,94 ± 1,51	20,3 ± 2,08
$(\Sigma$ AGPI+ $\Sigma$ AGMI)/ $\Sigma$ AGS	0,71 ± 0,04	0,60 ± 0,03	0,99 ± 0,08
UI	83,37 ± 7,24	82,53 ± 6,25	103,62 ± 8,83
Autres	1,1	3,45	1,44

Chaque acide gras est exprimé en pourcentage du total des acides gras observés et identifiés. Les données sont exprimées en pourcentage moyen  $\pm$  SEM (n=20). Les acides gras de moins de 1 % dans les trois types cellulaires en même temps ne sont pas mentionnés mais ont été utilisés pour le calcul des paramètres suivants : AGS : AG saturés, AGMI : AG monoinsaturés, AGPI : AG polyinsaturés, UI : index d'insaturation =  $\Sigma$ (% Acides gras insaturés x nombre d'insaturation)

Tableau 13 : Proportions des différents acides gras des membranes cellulaires de J774, THP1 et HMDM

Ces résultats sont comparables aux données de la bibliographie<sup>282,324,325</sup> et montrent que la répartition des AG des PL membranaires est différente en fonction du type de macrophages. Ces différences sont marquées entre les HMDM et les 2 lignées notamment au niveau des AGPI et plus spécifiquement de l'AA. Ceci est classiquement observé entre les cellules en culture primaire et le même type cellulaire en lignée continue quelle que soit l'espèce étudiée<sup>326</sup>. Le même SVF étant utilisé pour la culture des 3 types cellulaires, il ne peut être à l'origine des différences observées. C'est surtout l'écart de la teneur en AA des AG totaux qui est décrit dans la littérature. Cette différence explique que des résultats obtenus avec des lignées et de types cellulaires proches en culture primaire puissent ne pas être strictement identiques. Même si les travaux sur les lignées ont permis de bien décrire des voies biochimiques, elles n'ont pas toujours apporté quelque chose de significatif en physiopathologie. L'hypothèse souvent émise est qu'ayant moins d'AA au départ, cet AG est potentiellement moins mobilisé et donne moins d'eicosanoïdes. A ceci s'ajoute sans doute une utilisation préférentielle et potentiellement différente des pools d'AA des PL selon que les cellules

sont des lignées ou en culture primaire<sup>326</sup>. Cela justifie d'essayer d'avoir une idée la plus précise possible de la répartition des AG au sein des classes de PL et donc d'utiliser une technique NP-LC pour procéder à la séparation des différentes classes de PL sans hydrolyse préalable.

## 3.2 Quantification des différentes classes lipidiques

### 3.2.1 Chromatogramme et étalonnage

L'utilisation du support chromatographique polyvinylalcool associé à un gradient d'éluion permet de séparer 10 classes de PL, Figure 51. La zone d'éluion des PL débute à partir de la 8<sup>e</sup> minute avec la sortie des PA et se termine à 25 minutes avec l'éluion des LPC. Le début du chromatogramme ne sera pas étudié. Cette zone d'éluion correspond à la sortie d'autres composés que les PL, comme les AG libres et les lipides neutres. De plus, cette méthode chromatographique a été couplée à la spectrométrie de masse en utilisant une source Electrospray ne permettant pas l'ionisation des lipides neutres.

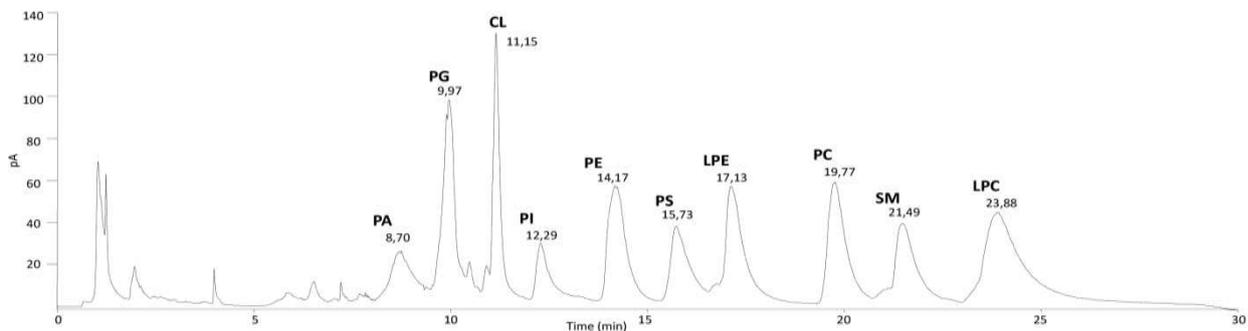


Figure 51 : Chromatogramme d'un mélange de standard de phospholipides ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) obtenus à partir du détecteur à aérosol chargé (CAD)

Le détecteur Corona est utilisé pour effectuer la quantification des différentes classes phospholipidiques. 5 dilutions successives de standards commerciaux de PL ont été préparées. La fonction réponse résultante est exprimée en  $\log Y$  (aire) en fonction du  $\log X$  (concentration). Pour chaque classe, les différentes équations sont reportées (Figure 52).

Les courbes d'étalonnage présentent un profil quasi linéaire pour la plupart des PL excepté pour les PA, PG et LPC. Pour le PA, le point de gamme à  $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  n'est pas détectable. Les différentes caractéristiques des méthodes sont présentées dans le Tableau 14.

On observe que la répétabilité des différentes méthodes est inférieure à 5 % hormis pour la concentration  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  pour la méthode PI et LPC. Par ailleurs, les écarts avec les valeurs théoriques sont inférieurs à 5 % pour la PA, PE, PS, LPE, PC et SM. Concernant les autres PL, certaines concentrations présentent des écarts importants comme la concentration  $0,025 \text{ g.L}^{-1}$  pour la CL,  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  pour la PG et les concentrations  $0,1$  et  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  pour les LPC. A partir de l'ensemble des résultats la quantification des classes phospholipidiques a été effectuée sur les échantillons biologiques.

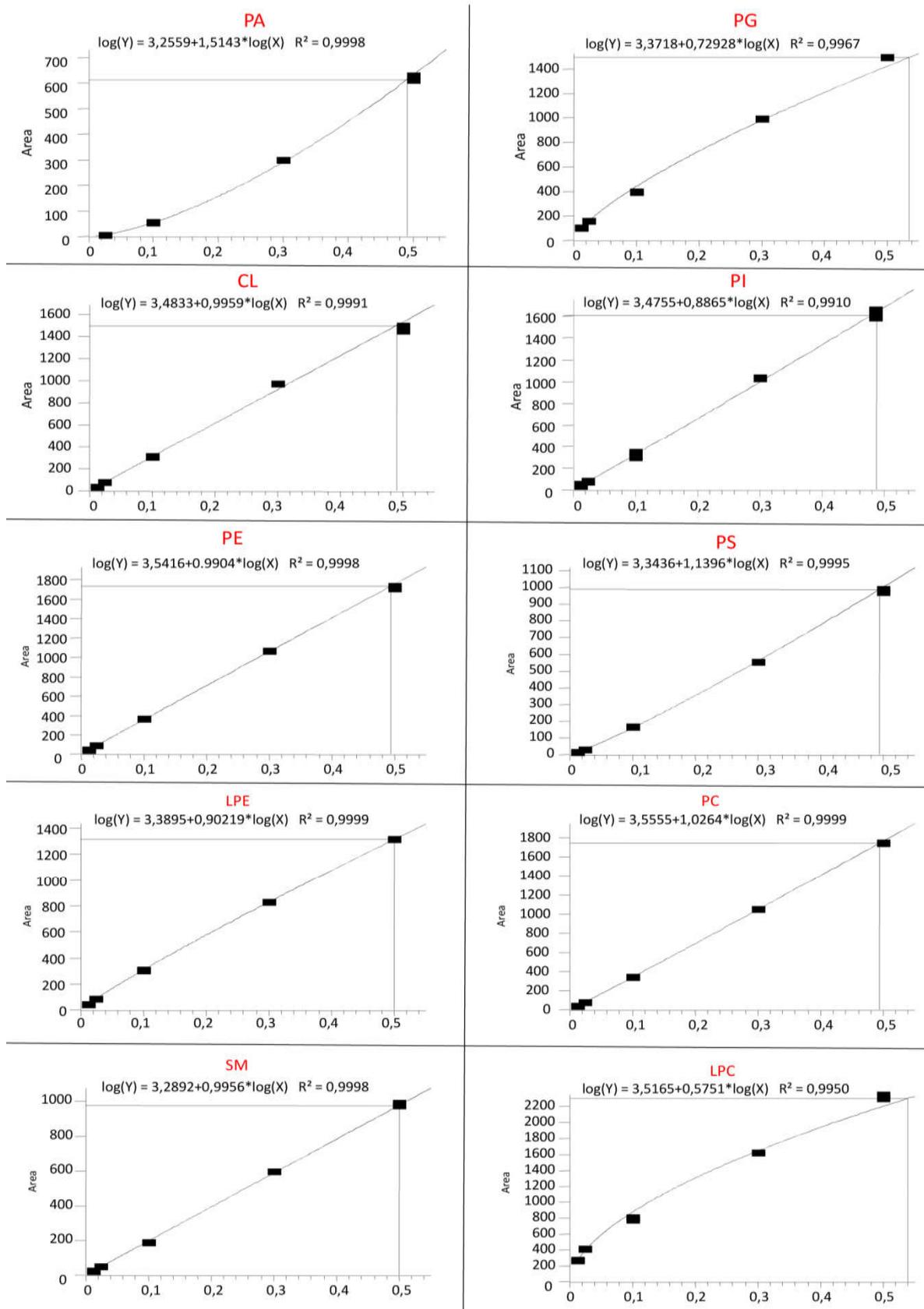


Figure 52 : Droite d'étalonnage des différentes classes phospholipidiques

Concentration (mg/mL)	12,5E-02	12,5E-02	25 E-02	0,1	0,1	0,3	0,5	0,5
<b>PA</b>								
Aire	Sans objet		6,647	54,773	56,795	299,366	628,092	613,337
X calculée	Sans objet		24,73E-02	0,099	0,102	0,305	0,498	0,490
Ecart (%)	Sans objet		-1,098	-0,460	1,952	1,851	-0,316	-1,868
CV Répéta (%)	Sans objet			1,693			1,11	
<b>PG</b>								
Aire	101,60	100,61	157,35	396,72	399,53	991,66	1495,68	1492,33
X calculée	13,44 E-02	13,26 E-02	24,48 E-02	0,087	0,087	0,305	0,536	0,535
Ecart (%)	7,5	6,1	-2,1	-12,9	-12,1	1,8	7,4	7,1
CV Répéta (%)	0,947			0,685			0,217	
<b>CL</b>								
Aire	36,86	38,16	93,95	348,35	344,90	970,25	1447,55	1494,62
X calculée	11,18 E-02	11,58 E-02	28,84 E-02	0,108	0,107	0,306	0,459	0,475
Ecart (%)	-10,54	-7,34	15,36	8,72	7,63	2,25	-8,01	-4,98
CV Répéta (%)	2,49			0,71			2,29	
<b>PI</b>								
Aire	65	62	110	402	375	1100	1603	1599
X calculée	13,32E-02	12,62 E-02	3,54	0,104	0,096	0,328	0,495	0,493
Ecart (%)	6,57	1,01	-3,54	4,03	-3,81	7,94	-0,96	-1,24
CV Répéta (%)	3,78			5,54			0,19	
<b>PE</b>								
Aire	45,53	44,27	89,41	367,59	365,91	1064,77	1704,37	1731,19
X calculée	12,55 E-02	12,19 E-02	24,80 E-02	0,103	0,102	0,302	0,486	0,494
Ecart (%)	0,36	-2,44	-0,82	3,34	2,87	0,81	-2,74	-1,20
CV Répéta (%)	2,01			0,33			1,11	
<b>PS</b>								
Aire	14,92	14,95	31,19	169,22	168,83	554,17	970,65	988,59
X calculée	12,47 E-02	12,50 E-02	23,83 E-02	0,105	0,104	0,297	0,486	0,494
Ecart (%)	-0,20	4,90 E-03	-4,70	5,07	4,86	-0,82	-2,69	-1,11
CV Répéta (%)	0,14			0,14			1,14	
<b>LPE</b>								
Aire	47,17	47,07	87,80	309,48	303,74	826,87	1314,05	1314,05
X calculée	12,53 E-02	12,51 E-02	24,96 E-02	0,100	0,098	0,299	0,500	0,500
Ecart (%)	0,28	0,05	-0,17	0,84	-1,23	-0,09	0,17	0,17
CV Répéta (%)	0,16			1,47			ND	
<b>PC</b>								
Aire	39,36	39,82	82,50	342,27	342,27	1049,37	1747,69	1745,79
X calculée	12,30 E-02	12,44 E-02	25,30 E-02	0,101	0,101	0,301	0,495	0,494
Ecart (%)	-1,58	-0,46	1,19	1,18	1,18	0,47	-0,92	-1,02
CV Répéta (%)	0,80			ND			0,07	
<b>SM</b>								
Aire	25,15	24,44	50,98	190,53	191,00	596,81	991,61	974,85
X calculée	12,68	12,32	25,78	0,096	0,097	0,305	0,507	0,499
Ecart (%)	1,42	-1,47	3,31	-3,10	-2,86	1,66	1,57	-0,14
CV Répéta (%)	2,05			0,17			1,21	
<b>LPC</b>								
Aire	267,78	271,66	414,47	780,51	811,58	1622,17	2347,06	2304,4
X calculée	12,80	13,12	27,35	0,082	0,087	0,293	0,557	0,539
Ecart (%)	2,36	4,96	9,39	-17,80	-12,03	-2,25	11,48	7,98
CV Répéta (%)	1,8			4,8			2,3	

Tableau 14 : Données complémentaires de l'étalonnage des classes phospholipidiques

Le détecteur Corona est un détecteur universel et sensible. Cependant, la spécificité de la méthode NP-LC-Corona est apportée uniquement par l'observation des temps de rétention. Profitant de la double détection Corona-spectromètre de masse, le spectre de masse de chaque pic chromatographique des échantillons biologiques a été observé pour apporter de la spécificité à la quantification Corona. La gamme  $m/z$  attendue de chaque classe phospholipidique a été évaluée en consultant la base de données LipidMaps.

Par ailleurs, deux types de normalisation ont été réalisés. La première consiste à rapporter chaque quantité de PL aux résultats des dosages des protéines totales effectués avant extraction selon le protocole de Peterson<sup>327</sup>. Cette normalisation permet de rapporter la quantité de PL à la quantité de biomasse initialement présente. La seconde normalisation consiste à exprimer les quantités de chaque classe en pourcentage de la quantité totale de PL dont la spécificité a été vérifiée par chromatographie (temps de rétention) et spectrométrie de masse.

### **3.2.2 Analyse des échantillons biologiques, des interférences et des co-élutions**

La comparaison des différents chromatogrammes permet dans un premier temps d'estimer la répartition des classes phospholipidiques des échantillons. Comme attendu la PC est la classe de PL la plus abondante dans tous les extraits de macrophages. Les autres classes sont principalement la PE et la PI et PS. L'observation des chromatogrammes ne permet pas de classer l'abondance de ces différentes classes, (Figure 53).

Les CL sont aussi présentes dans les échantillons et semblent particulièrement importantes chez les HMDM. L'observation du courant ionique total des échantillons de HMDM montre que ce pic est constitué d'impuretés ou de composés non ionisables. Ces interférences et les valeurs des aires de CL ne permettront pas de réaliser la quantification des CL pour les HMDM. Concernant les J774 et les THP1 il existe un pic correspondant aux CL dont les valeurs des aires pourront être reliées à une concentration. Cependant, le dosage des protéines montre que la quantité de biomasse recueillie est deux fois plus importante pour les lignées cellulaires (J774 et THP1) que pour les cultures primaires de macrophages humains.

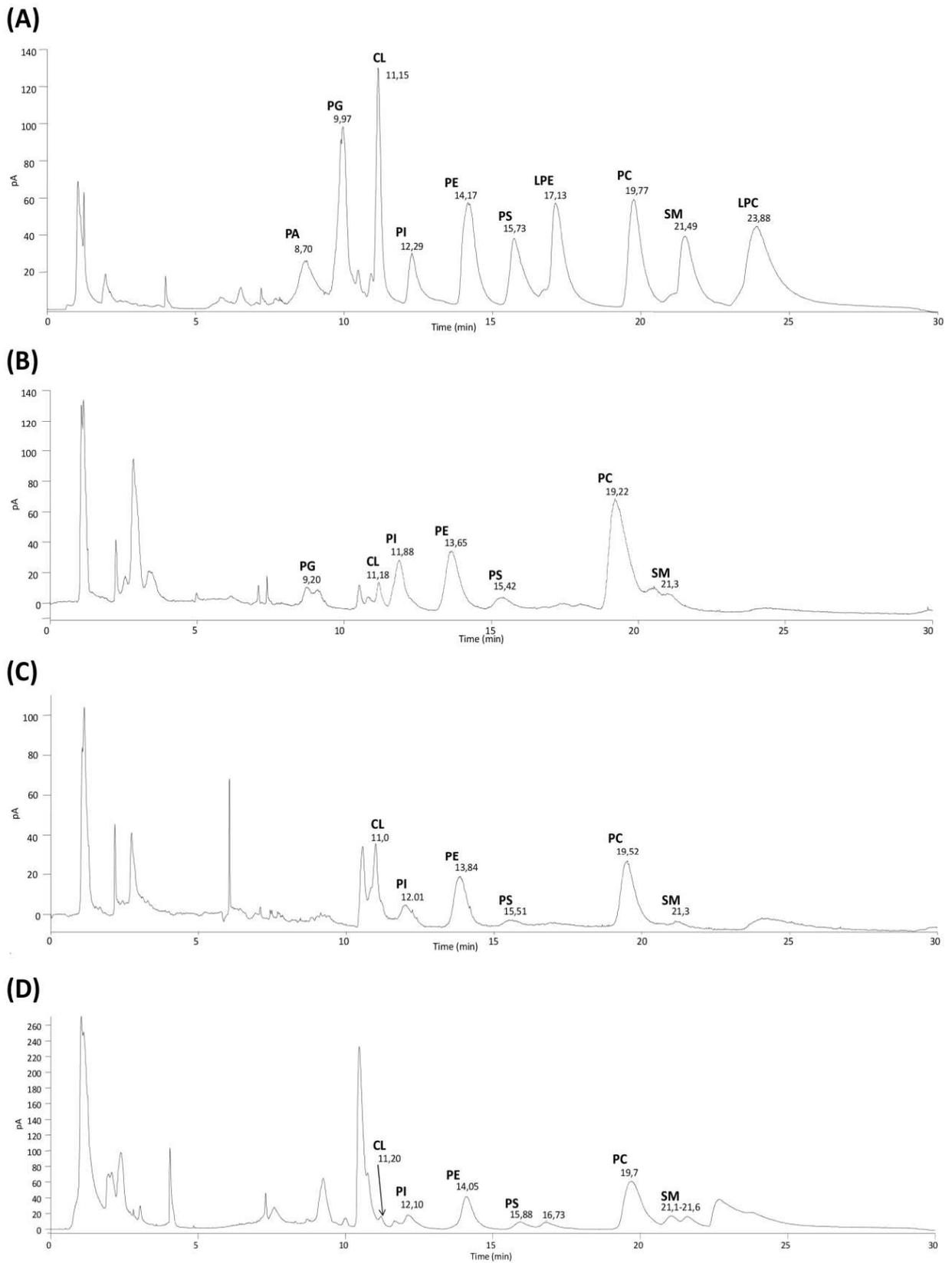
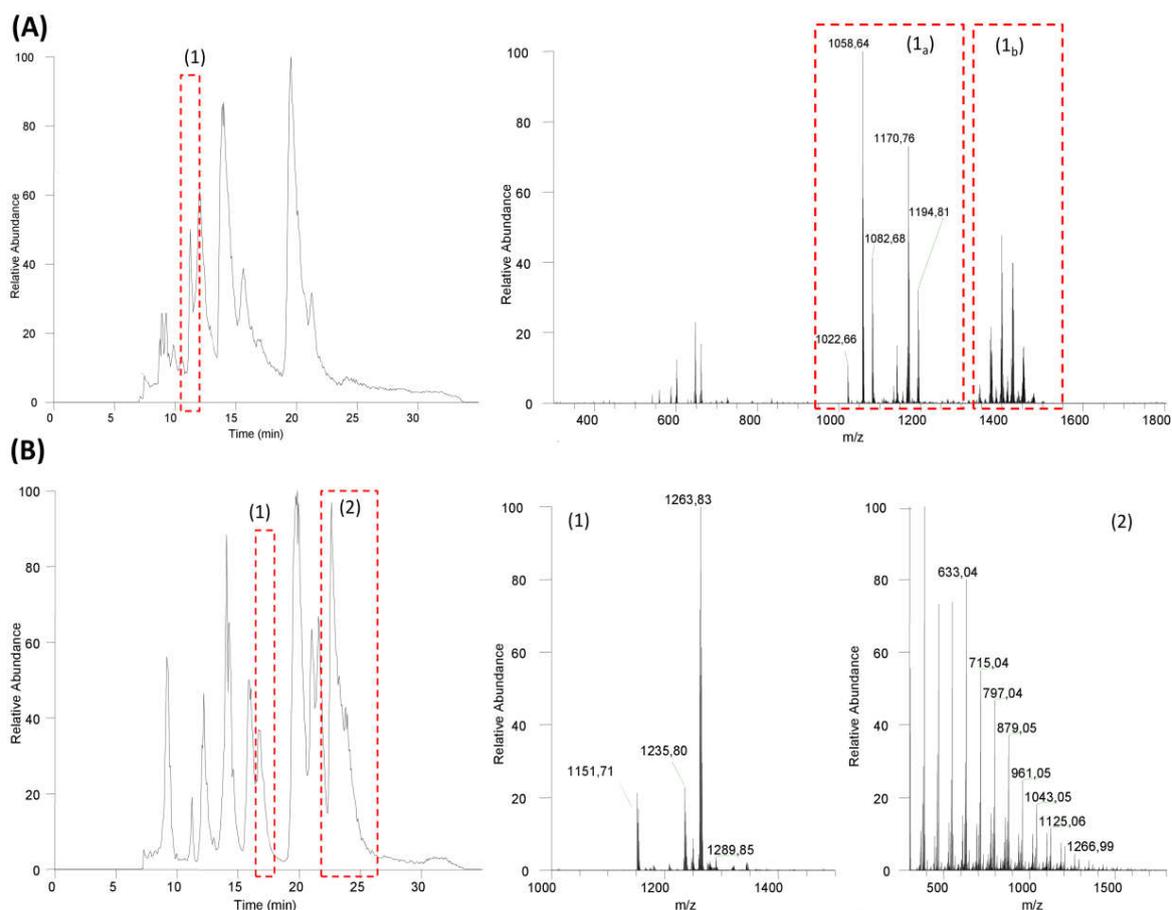


Figure 53 : Chromatogrammes obtenus en détection Corona d'un contrôle qualité de standards de phospholipides (A), d'un échantillon biologique d'extrait de macrophages J774 (B), de THP1 (C) et de HMDM (D)

Les échantillons de HMDM présentent un pic chromatographique au temps de rétention de 16,7 minutes. Or, les LPE ont une zone d'élution autour de 17 minutes. Ces différences ne sont pas forcément significatives étant donné la largeur des pics chromatographiques en NP-LC. Cependant, l'observation des spectres de masse correspondants montre des  $m/z$  compris entre 1150 et 1300. L'identification de ces ions grâce aux données de MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup> montre que ces composés sont des GM3 et non des LPE. Les THP1 présentent aussi dans cette zone un pic moins intense que les HMDM. L'aire du pic de ganglioside n'a pas été prise en compte dans l'expression des résultats puisque l'étalonnage correspond aux standards de LPE. Il n'est donc pas possible de rendre compte d'une concentration en ganglioside. Néanmoins, si on applique l'équation de l'étalonnage des LPE pour quantifier les gangliosides, on observe que ces espèces ne sont pas quantifiables dans les extraits de lipides totaux de J774 et THP1 et représentent 4 % des espèces lipidiques pour les HMDM. Concernant les LPC, on observe un pic chromatographique pouvant correspondre au temps de rétention de cette classe. Le spectre de masse correspondant est plutôt en faveur d'impuretés accumulées lors de la préparation de l'échantillon.

Enfin, les J774 et les THP1 présentent une abondance particulière dans la zone des PG. L'observation des spectres de masse montre qu'il existe des coélutions entre les espèces moléculaires de PG et les hexosylcéramides. Comme pour les gangliosides, ces différentes espèces n'ont pas été prises en compte dans les résultats de la quantification relative. La Figure 54 montre les différents spectres de masse MS1 des espèces précédemment citées (gangliosides, hexosylcéramides, impuretés au niveau du pic de LPC).



**Figure 54 : Courant ionique total d'un échantillon de THP1 (A) et HMDM (B). Pour les THP1, le spectre de masse correspondant au temps de rétention 10,7-11,6 montre des hexosylcéramides (1a) et des cardiolipines (1b). Pour les HMDM, les spectres de masse (1) représentent les espèces de gangliosides et (2) représente les impuretés correspondant aux temps de rétention des LPC**

### 3.2.3 Quantification des classes phospholipidiques des échantillons biologiques

La PC est la classe de PL la plus abondante. En effet, elle représente  $51,4 \pm 5,1$  % pour les J774 et de  $47,5$  % pour les THP1 et HMDM. Puis la PE représente  $20$  % des PL (J774 :  $19,6 \pm 0,8$  ; THP1 :  $22,6 \pm 5,6$  ; HMDM :  $22,0 \pm 0,9$ ) tandis que la PS (J774 :  $7,5 \pm 0,9$  ; THP1 :  $9,5 \pm 1$  ; HMDM :  $7,8 \pm 0,6$ ) et la PI (J774 :  $10,5 \pm 1,6$  ; THP1 :  $8,2 \pm 1,6$  ; HMDM :  $5,6 \pm 0,5$ ) représente autour de  $10$  %.

Pour les SM, on observe que les J774 et THP1 présentent une composition relative assez proche ( $5,6 \pm 1,6$  pour les J774 et  $4,6 \pm 0,6$  pour les THP1) tandis que cette classe est significativement augmentée chez les HMDM ( $18,9 \pm 1,3$ ). Dans l'ensemble des compositions les PA et PG ne sont pas quantifiables et les CL sont détectables uniquement chez les J774 ( $4,6 \pm 1,3$ ) et THP1 ( $7,6 \pm 1,8$ ).

Il existe une certaine homologie de composition des différentes classes lipidiques sur les trois lignées de macrophages. En effet, la PC représente un peu moins de 50 % puis la PE autour de 20 % et la PI et la PS représentant chacune autour de 10 %, Figure 55.

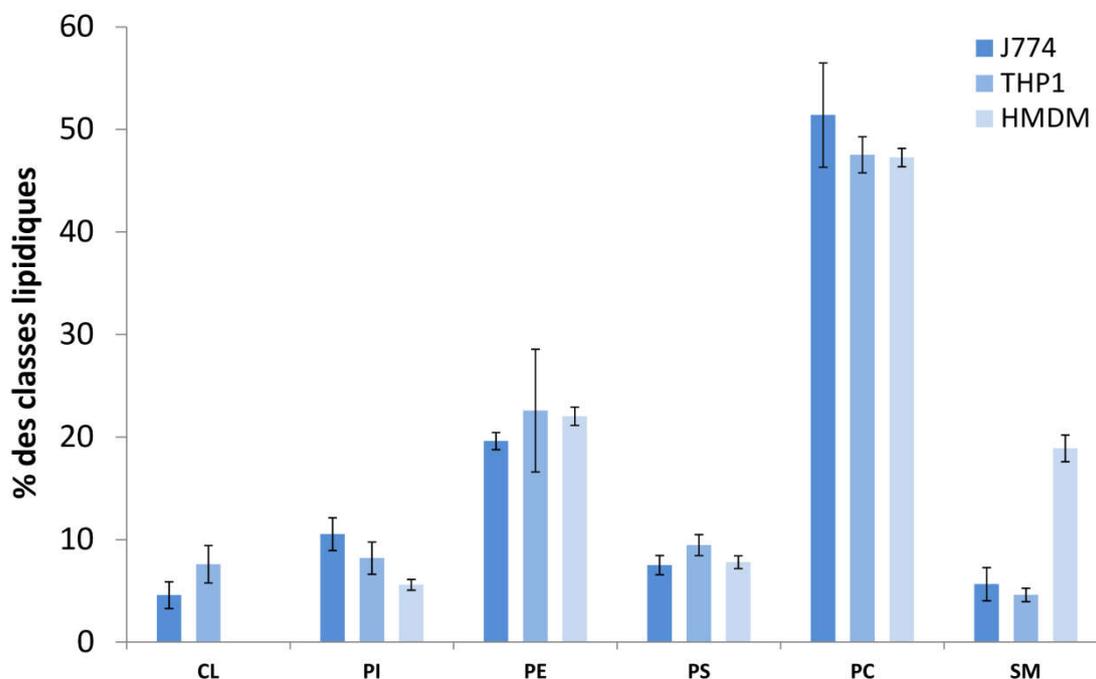
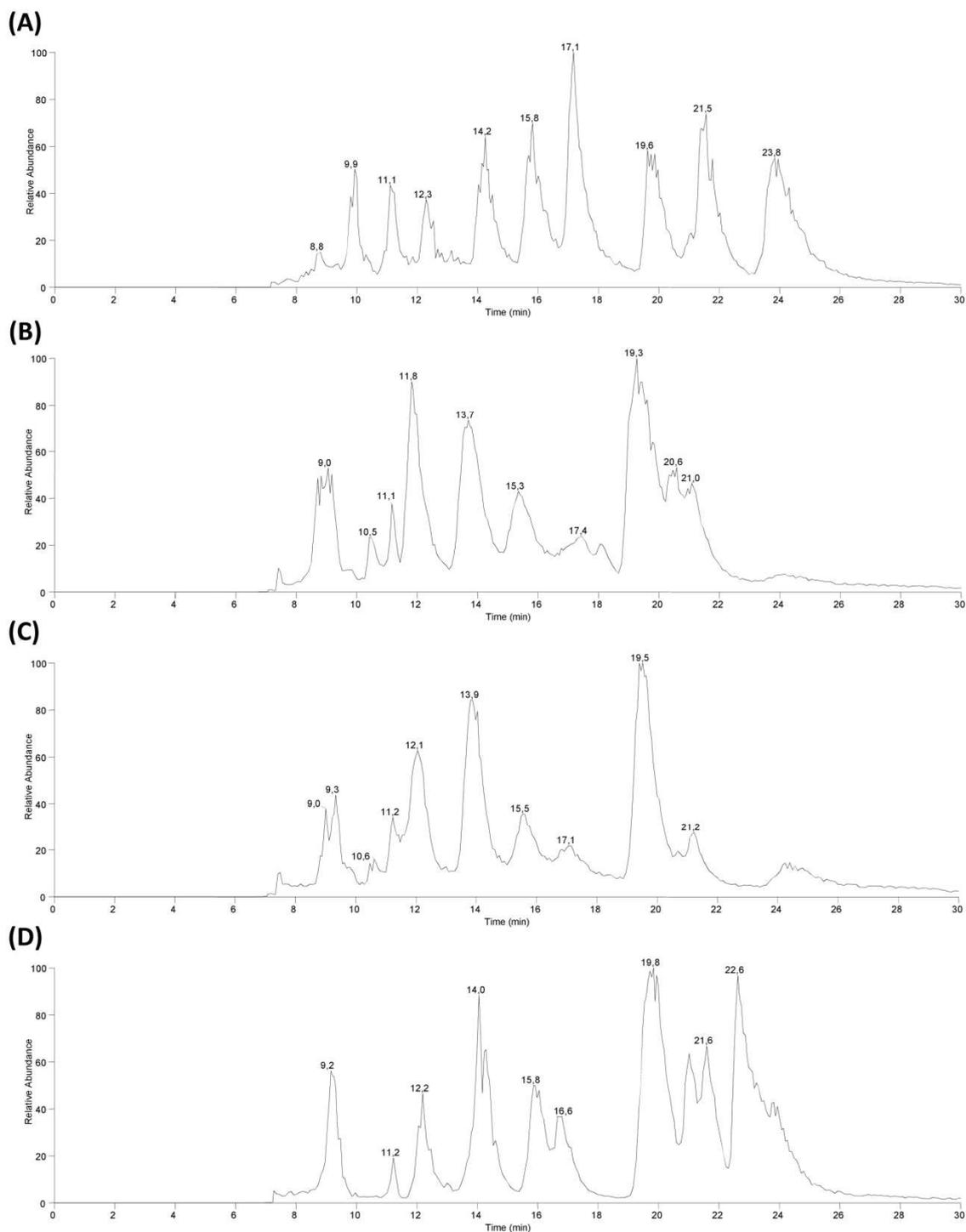


Figure 55 : Pourcentage de différentes classes lipidiques exprimées en mg de lipides par mg de protéines quantifiables par détection Corona

L'étude de la composition de chaque espèce moléculaire constitutive de chaque pic chromatographique est nécessaire pour savoir si l'on peut expliquer la différence de composition des AG méthylés.

### 3.3 Etude comparative des profils lipidiques obtenus par LC-MS LTQ-Orbitrap™ des macrophages J774, THP1 et HMDM

Pour chaque type de macrophages, la composition des différentes classes lipidiques a été déterminée en utilisant les données Full-Scan de l'Orbitrap™. Chaque ion a été identifié à partir du moment où ces données de fragmentation étaient disponibles. Les courants ioniques totaux du mélange de standards de PL et des extraits des lipides biologiques sont présentés Figure 56.



**Figure 56 : Courant ionique total d'un standard de phospholipides (A) d'un extrait de J774 (B), de THP1 (C) et de HMDM (D)**

Pour les CL, l'identification des différentes espèces moléculaires a été réalisée en deux temps. La première acquisition a été réalisée en mode data-dépendant afin de balayer l'ensemble des ions correspondant aux CL. Dans un deuxième temps, cet ensemble d'ions a été analysé spécifiquement afin de réaliser leur fragmentation. En effet, la fragmentation d'une CL donne deux PA en  $MS^2$ . La fragmentation en  $MS^3$  de ces deux PA permet de déterminer la composition des AG. Lorsqu'il existe

une coélution, l'utilisation des données issues du mode data dépendant n'est pas forcément suffisante pour identifier chaque espèce moléculaire.

Ainsi, 165 ions ont été identifiés à partir des extraits des 3 types de macrophages. La répartition s'effectue entre 38 PC, 29 PI, 27 PE, 16 CL, 14 PG, 14 PS, 11 SM, 2 PA ainsi que 7 hexosylcéramides et 7 GM3 (Tableau 15). Au regard de la quantité d'informations extraite, l'ensemble de ces différents ions a été classé en 3 catégories :

- 1) les ions communs aux trois types de macrophages
- 2) les ions spécifiques de chaque type cellulaire
- 3) les ions identifiés uniquement dans 2 types cellulaires

Le pourcentage de chaque ion est obtenu en déterminant l'ion majoritaire (100 %) de la classe lipidique correspondante. La moyenne et l'écart type sont calculés à partir de l'observation des intensités de 4 profils lipidiques différents pour chaque type de macrophages.

	Ions communs	Ions spécifiques			Ions présents dans deux types de macrophages			Total
		J774	THP1	HMDM	J774 et THP1	THP1 et HMDM	J774 et HMDM	
PA	0	1	1	0	0	0	0	2
PG	2	4	2	2	4	0	0	14
CL	5	2	2	3	3	0	1	16
PI	12	6	3	4	3	0	1	29
PE	10	1	5	3	4	3	1	27
PS	6	0	0	2	2	1	3	14
PC	14	7	4	7	6	0	0	38
SM	5	1	2	2	0	1	0	11
GM 3	0	0	0	5	0	2	0	7
Hexosylcéramides	0	0	0	7	0	0	0	7
<b>Total</b>	54		76			35		165
<b>Total J774</b>	54		21		22	0	6	103
<b>Total THP1</b>	54		26		22	7	0	109
<b>Total HMDM</b>	54		29		0	7	6	96

Tableau 15 : Synthèse du nombre d'ions identifiés par classe lipidique et par type de macrophages

### 3.3.1 Espèces lipidiques communes aux trois types de macrophages

Les espèces lipidiques communes aux trois types de macrophages représentent 54 ions identifiés. Ils se répartissent entre 14 PC, 12 PI, 10 PE, 6 PS, 5 SM, 5 CL et 2 PG. Les différentes classes lipidiques sont présentées dans l'ordre décroissant du nombre d'espèces moléculaires obtenues. Les PL sont la première catégorie à être présentée puis les sphingolipides. Pour chaque classe, l'ordre de présentation est effectué selon les pourcentages obtenus en quantification Corona ; lorsqu'une classe n'est pas quantifiable par cette méthode c'est l'ordre d'élution qui est alors utilisé.

#### 3.3.1.1 PC

Parmi les 38 ions de PC identifiés, 14 sont exprimés dans les trois types de macrophages. L'ion majoritaire pour les trois types est l'ion  $m/z$  818,58 ; PC (16:0/18:1) et PC (16:1/18:0). Ces ions ont été classés suivant un critère quantitatif. La Figure 57 (A) présente les PC ayant une abondance relative supérieure à 10 % (9 ions de PC) et sont majoritairement des diacyl-PC (1 éther lipide sur 9) ayant des AG saturés ou monoinsaturés. Pour les ions de la Figure 57 (B), ils correspondent exclusivement à des éthers lipides contenant des AGPI comme C20:4, C22:5, et C22:6.

D'un point de vue quantitatif, cinq ions présentent des différences d'expression entre les différents types de macrophages. L'ion  $m/z$  776,58 est plus largement exprimé dans la lignée J774 (54 %) par rapport aux THP1 et aux HMDM (respectivement 33 % et 5 %). Pour les THP1, l'ion  $m/z$  790,56 représente 94%, (J774 : 42 % et HMDM : 24,1 %). Pour les HMDM, l'ion  $m/z$  792,57 (65,3 %) (J774 : 33 % et THP 1 : 15 %) et  $m/z$  846,62 (HMDM : 28 %), 13 % chez les J774 et 10 % chez les THP1. Enfin l'ion  $m/z$  844,60 présente des abondances relatives comparables entre les J774 et les HMDM et plus faibles pour les THP1. La Figure 57 (B) présente deux groupes d'espèces observables. La première correspond à l'espèce  $m/z$  876,61 qui s'exprime de façon comparable entre les différents types de macrophages (1,6 %). Le deuxième groupe est constitué de quatre ions plus fortement exprimés chez les J774 et HMDM. Ce sont principalement des éthers lipides comme  $m/z$  826,59 représentant 8,6 % pour les HMDM ; 6,0% pour les J774 ; 3,1 % pour les THP1. L'ion  $m/z$  852,61 représentant 7,0 % pour les J774, 8,5 % pour les HMDM et 1,6 % pour les THP1 et l'ion 854,62 (J774 : 5 % ; HMDM 2,9 % et THP1 0,3 %). Enfin l'ion le moins abondant de ce groupe  $m/z$  : 878,62 représente 2,1 % pour les J774, 1,3 % pour les HMDM et 0,3 % pour les THP1.

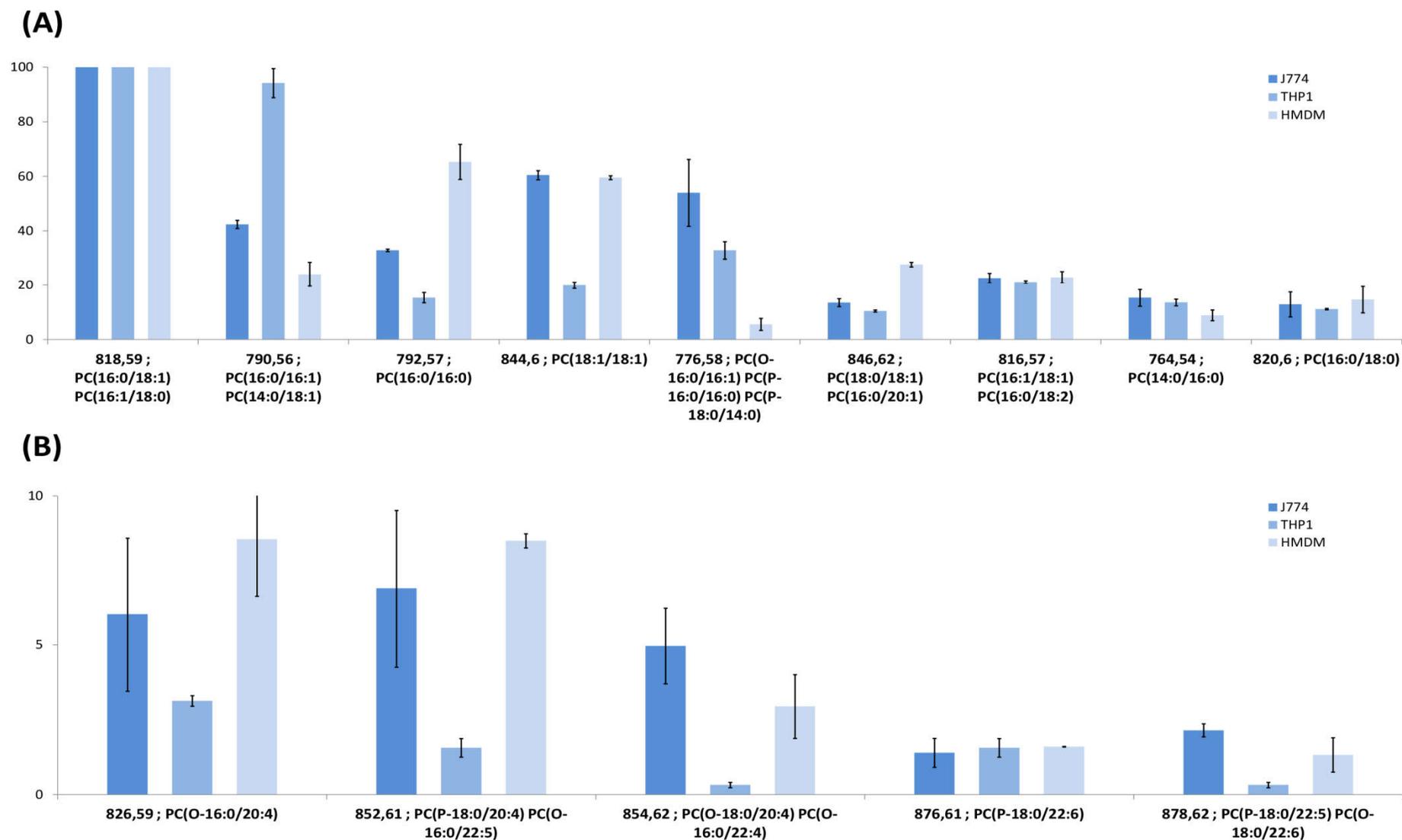


Figure 57 : Phosphatidylcholines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire

### 3.3.1.2 PE

Parmi les 27 PE étudiés 10 sont communes aux trois types de macrophages. On dénombre une majorité d'éthers lipidiques (7 ions) contenant une part importante d'AGPI. Pour les trois ions correspondant à des diacyl-PE, ces espèces contiennent principalement des AGS (C16:0/C18:0), AGMI (C18:1) et AGPI (C18:2).

Comme ce sera le cas pour les PI, l'ion majoritaire des PE est différent en fonction des types de macrophages. Pour les J774 et les THP1 l'ion majoritaire est  $m/z$  700,53 ; PE (P-16:0/18:1) et PE (P-18:0/16:1), (HMDM : 21,8 %). L'ion majoritaire des HMDM est un éther-PE contenant un AGPI correspondant à l'ion  $m/z$  722,51 ; PE (P-16:0/20:4) et PE (O-16:0/22:5), il représente 85,7 % pour les J774 et 75,6 % pour les THP1.

Concernant les autres ions, trois motifs d'expression peuvent être décrits. Le premier concerne  $m/z$  716,52 et  $m/z$  724,52. Ils sont plus abondants chez les lignées de macrophages : J774 (48,2 % et 36,3 % respectivement) et THP1 (62 % et 43 %), et représentent respectivement 18,9 % et 9,3 % chez les macrophages humains. Le deuxième motif est observé pour  $m/z$  774,56 et  $m/z$  776,55. Ces deux ions ont des intensités relatives proches entre les J774 et les HMDM, respectivement 30 % et 20 %. Pour les THP1, ces deux ions représentent respectivement 18,3 % et 14,4 % de l'ion majoritaire. Un troisième et dernier motif est représenté par les ions  $m/z$  742,54 et  $m/z$  744,55. Leur niveau d'intensité relative est plus important pour un type de macrophages alors qu'il est comparable pour les deux autres. L'ion  $m/z$  742,54 est exprimé à hauteur de 60 % chez les J774 alors qu'il représente 26 % et 28 % respectivement pour les THP1 et HMDM. L'ion  $m/z$  744,55 est plus largement exprimé chez les HMDM (67 %) et 43 % pour les THP1 et 25 % pour les J774. Enfin, l'ion  $m/z$  746,64 a une intensité comparable entre les différents types, autour de 50 % de l'ion majoritaire. La Figure 58 présente les différents ions et identifications réalisées pour les espèces communes entre les différents types de macrophages.

Il est intéressant de constater les similitudes entre THP1 et HMDM concernant les plasmalogènes de PE possédant en *sn2* des AGPI (AA, EPA, DPA et DHA). Plusieurs travaux considèrent en effet que ce type de PL constituerait dans les cellules un vrai réservoir d'AGPI rapidement mobilisables<sup>326</sup>. Ceci permet de pouvoir envisager dans de futurs travaux d'utiliser cette lignée de monocytes-macrophages humains dans le cadre d'étude du métabolisme des AGPI.

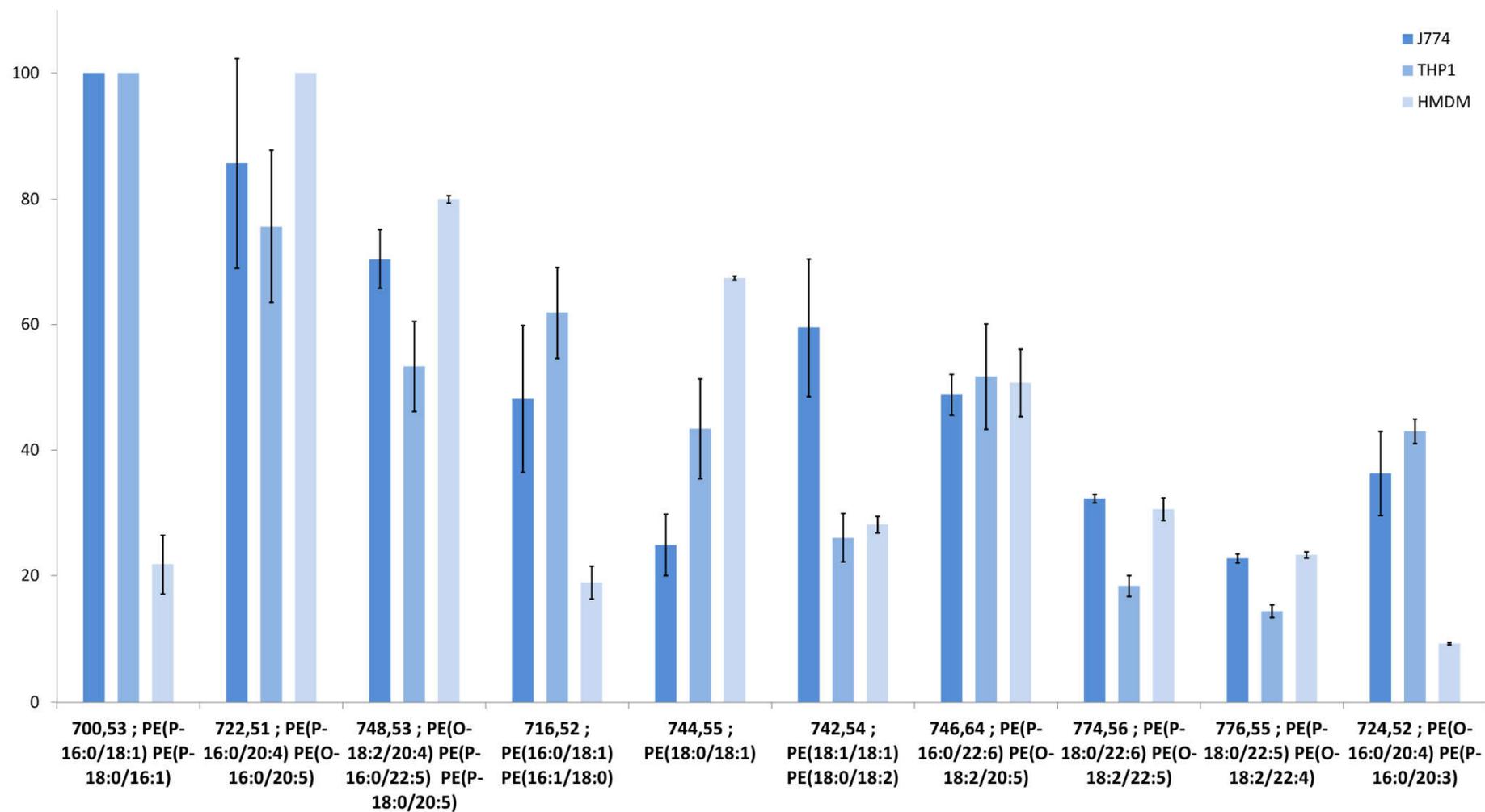


Figure 58 : Phosphatidyléthanolamines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire

### 3.3.1.3 PI

Parmi les 29 ions correspondant à des PI, 12 sont communs à tous les types de macrophages. Comme précédemment deux groupes d'ions sont envisagés, la limite de l'abondance relative étant fixée pour les PI à 30 %.

Les ions majoritaires sont différents pour les trois types de macrophages, (Figure 59 (A)). Pour les J774, l'ion majoritaire est  $m/z$  861,55 ; PI (18:1/18:1) et PI (18:0/18:2). Cet ion est présent chez les deux autres types de macrophages (THP1 : 48,7 % et HMDM : 44,2 %). Pour les THP1, l'ion majoritaire est  $m/z$  835,53 ; PI (16:0/18:1) et PI (16:1/18:0) et représente 25 % pour les J774 et HMDM. Enfin, pour les HMDM l'ion majoritaire est un diacyl-PI avec un AGPI :  $m/z$  885,55 ; PI (18:0/20:4) et PI (18:1/20:3) qui représente 95 % chez les THP1.

Parmi les espèces représentant moins de 30 % de l'ion majoritaire (Figure 59 (B)), on observe plusieurs motifs d'expression. Les ions  $m/z$  869,55 ; 883,53 et 911,56 présentent un profil d'expression constante pour les trois types de macrophages respectivement 6 %, 17 % et 16 %.

Trois ions sont particulièrement exprimés chez les THP1 comme  $m/z$  833,52 représentant 15 % (J774 et HMDM : 9 %),  $m/z$  857,52 représentant 26 % chez les THP1 (HMDM 6,3 %, J774 2,9 %) et  $m/z$  859,53 représentant 17 % chez les THP1. Enfin,  $m/z$  889,58 est plus largement exprimé chez les J774 et un peu moins de 10 % dans les autres échantillons.

Il est important de souligner ici aussi la similitude assez forte de la composition entre les HMDM et les THP1 concernant les PI de type 18:0/20:4 et 18:0/20:3. Nous verrons dans le chapitre suivant l'impact important qu'aura la modification de composition de ces métabolites de PI dans les cellules incubées en présence d'EPA. Le projet qui en découle devrait pouvoir utiliser les THP1 pour toutes les mises au point nécessaires et ne pouvoir utiliser les HMDM que dans le cadre de la confirmation des résultats obtenus avec la lignée THP1.

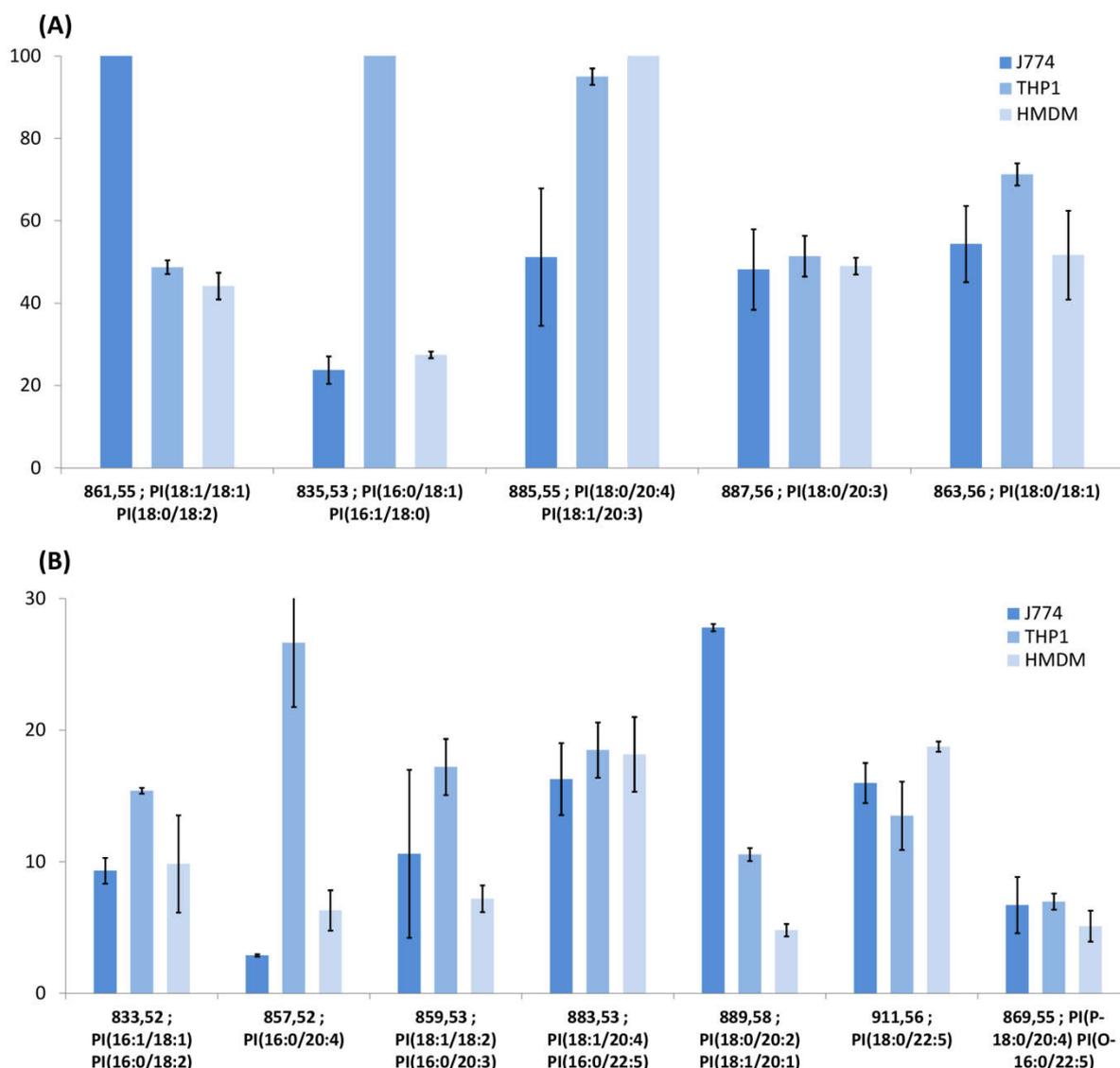


Figure 59 : Phosphatidylinositols communs aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire

### 3.3.1.4 PS

Parmi les 14 PS identifiées, 6 sont communes à tous les types de macrophages. L'ion  $m/z$  788,54 ; PS (18:0/18:1) est l'ion majoritaire pour les trois types d'extraits lipidiques analysés. D'un point de vue qualitatif, on observe que les PS contenant des AGS et des AGMI sont majoritaires.

On constate que les ions  $m/z$  760,51 et  $m/z$  786,53 sont plus fortement exprimés parmi les J774 et THP1. Tandis que les ions  $m/z$  836,54 ;  $m/z$  834,53 et  $m/z$  790,55 présentent des abondances relatives comparables entre les différents types de macrophages. Les espèces moléculaires ayant des

AGPI sont quantitativement moins abondantes que les espèces présentant des AGS, AGMI (Figure 60).

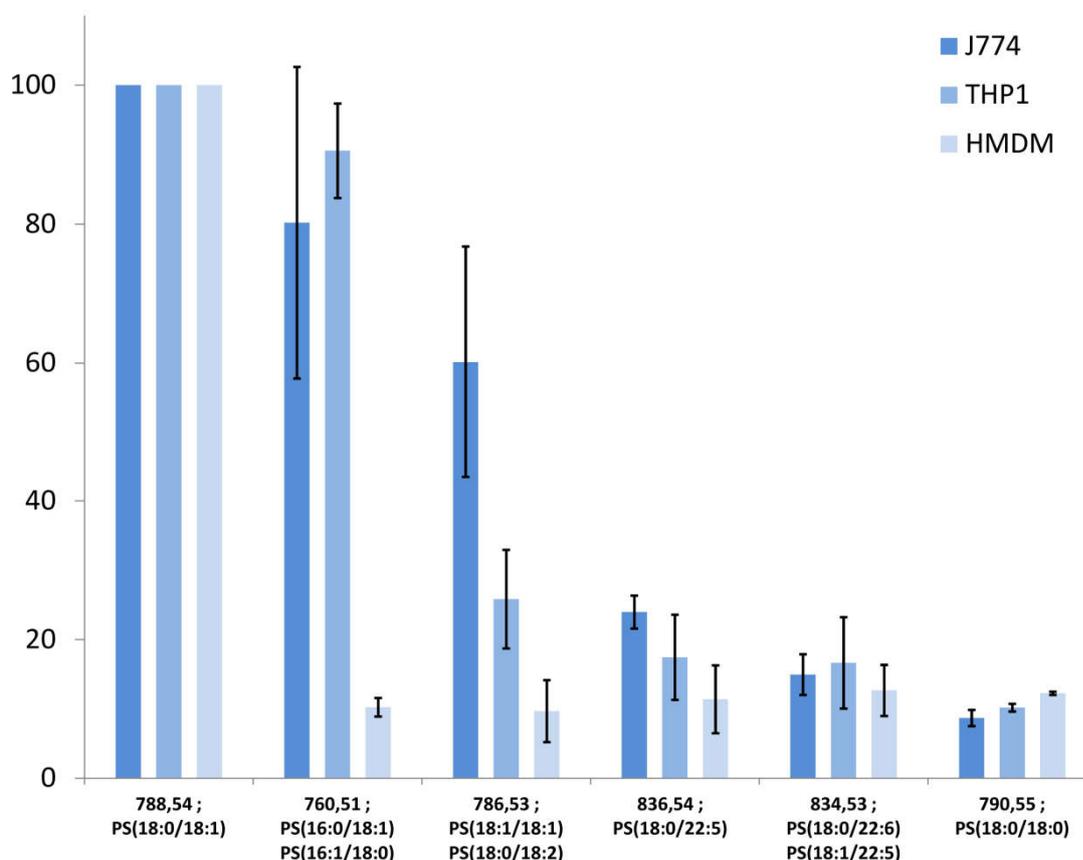


Figure 60 : Phosphatidylsérines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire

### 3.3.1.5 CL

Parmi les 16 ions de cardiolipines identifiés, seulement 5 sont communs aux trois types de macrophages. Seule la CL majoritaire des HMDM est présentée ( $m/z$  1425,98 ; CL (16:1/18:1\_18:1/18:2)). Cet ion est aussi largement exprimé dans les deux autres lignées (82 % pour les J774 et 75 % pour les THP1).

Par ailleurs, on observe que l'ion  $m/z$  1399,96 ; CL (16:1/18:1\_16:1/18:1) est fortement exprimé pour les J774 et THP1 (80 %) et ne représente que 45 % pour les HMDM. A l'inverse l'ion  $m/z$  1451,99 ; CL (18:1/18:2\_18:1/18:2) est plus fortement représenté chez les HMDM (86 %) que chez les J774 (35 %) et THP1 (30 %). Les deux autres espèces présentées ont des motifs d'expression particuliers et représentent entre 40 et 60 % de l'ion majoritaire (Figure 61).

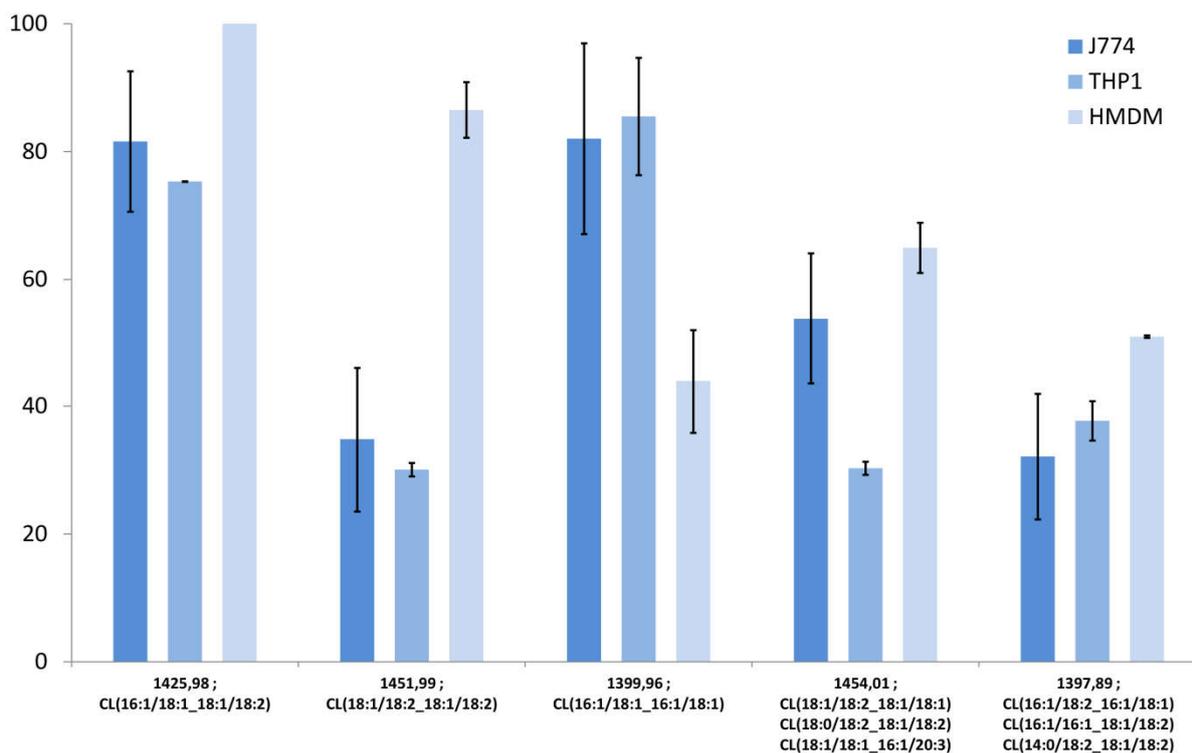


Figure 61 : Cardiolipines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire

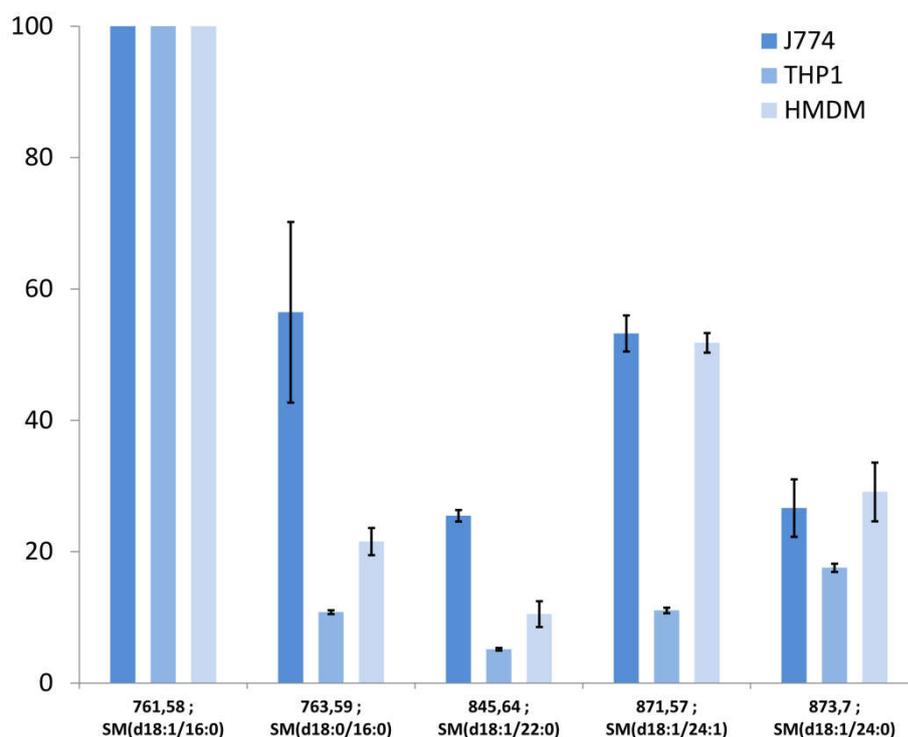
### 3.3.1.6 PG

Parmi les 14 espèces de PG identifiées au cours de cette étude seulement deux ions sont communs à toutes les espèces. On observe que l'ion  $m/z$  747,52 ; PG (16:0/18:1) et PG (16:1/18:0) est l'ion majoritaire pour les THP1 et représente  $16,6 \pm 5,3$  % pour les J774 et  $38,0 \pm 1,7$  % pour les HMDM. L'ion  $m/z$  773,53 ; PG (18:1/18:1) est le PG majoritaire pour les J774 et ne représente que  $8,4 \pm 0,6$  % pour les THP1 et  $93,8 \pm 5,2$  % pour les HMDM.

### 3.3.1.7 SM

Parmi les 11 espèces de SM identifiées, seulement 5 sont communes aux trois types de macrophages. Il existe une majorité de squelette sphingosine (4 espèces) et seulement 1 espèce avec un squelette sphinganine ( $m/z$  763,59). L'ion majoritaire est commun à tous les échantillons étudiés, c'est l'ion  $m/z$  761,58 ; SM (d18:1/16:0). L'ion  $m/z$  763,59 ; SM (d18:0/16:0), correspondant au dérivé sphinganine de l'ion majoritaire, présente une intensité relative importante pour les J774 (56,5 %) et beaucoup plus faible pour les HMDM (21,5 %) et THP1 (10,7 %).

Les ions  $m/z$  871,57 et  $m/z$  873,70 sont plus largement exprimés chez les J774 et HMDM par rapport aux THP1. L'ion  $m/z$  871,57 est exprimé à hauteur de 50 % pour les HMDM et les J774 et 10 % pour les THP1. L'ion  $m/z$  873,70 représente autour de 30 % pour les HMDM et J774 et 11 % pour les THP1. Les deux autres espèces présentées (Figure 62) présentent un profil d'expression relativement comparable entre les différentes lignées. Les J774 présentent le pourcentage d'intensité le plus élevé pour les ions  $m/z$  763,59 et  $m/z$  845,64 respectivement 56 % et 25 % pour les J774. Pour les HMDM, ce pourcentage est plus faible (21,5 % et 10,5 %) et encore plus faible pour les THP1 (10,8 % et 5 %).



**Figure 62 : Sphingomyélines communes aux trois types de macrophages et leurs intensités relatives exprimées en pourcentage de l'ion majoritaire**

Ainsi, de nombreuses espèces lipidiques sont partagées entre les différents types de macrophages. Il s'agit maintenant de présenter les espèces qui pourraient être considérées comme spécifiques de chaque macrophage.

### 3.3.2 Espèces lipidiques spécifiques d'une seule type de macrophage

#### 3.3.2.1 Espèces lipidiques identifiées uniquement chez les macrophages J774

21 ions sont uniquement présents chez les J774 qui se répartissent en 7 PC, 6 PI, 4 PG, 2 CL 1 SM et 1 PE. Aucune PS n'est présente dans cette liste (Tableau 16).

Les espèces moléculaires de PC, PI et PE, sont uniquement des éthers-PL excepté l'ion  $m/z$  865,57. Les PI et PE sont principalement des espèces moléculaires constituées d'AGS ou AGMI et les espèces moléculaires de PC se répartissent équitablement entre les différents types AG (AGS, AGMI et AGPI). Ainsi les caractéristiques des profils des éthers lipides permettent de caractériser les macrophages J774. Quatre PG sont caractéristiques des J774 qui sont en majorité des espèces moléculaires contenant des AGPI ( $m/z$  771,52 ; 799,55 et 819,59) dont l'intensité représente 20 % de l'ion majoritaire. Par ailleurs, deux CL spécifiques des J774 représentent 40 % de l'ion majoritaire. Enfin un seul sphingolipide est spécifique de cette lignée.

Classe lipidique	m/z	Identification	% de l'ion majoritaire ± écart type
<b>PC</b>			
	830,63	PC (P-18:0/18:1) PC (O-16:0/20:2)	31,3 ± 4,1
	750,56	PC (O-16:0/14:0)	12,8 ± 1,5
	806,58	PC (O-16:0/18:0) PC (O-18:0/16:0)	7,9 ± 4,1
	858,65	PC (P-18:0/20:1) PC (P-20:0/18:1) PC (O-18:0/20:2) PC (O-16:0/22:2)	2,6 ± 0,1
	880,64	PC (O-18:0/22:5) PC (P-18:0/22:4)	2,6 ± 0,05
	856,64	PC (O-18:0/20:3) PC (P-18:0/20:2) PC (O-16:0/22:3)	2,1 ± 0,2
	882,65	PC (O-18:0/22:4)	1,7 ± 0,7
<b>PE</b>			
	726,54	PE (O-18:2/18:1) PE (P-18:0/18:2) PE (P-16:0/20:2)	39,6 ± 7,8
<b>PI</b>			
	847,57	PI (P-18:0/18:1) PI (O-16:0/20:2)	26,1 ± 2,6
	821,53	PI (O-16:0/18:1)	12,5 ± 1,0
	849,58	PI (O-18:0/18:1)	12,5 ± 0,8
	873,58	PI (P-18:0/20:2) PI (O-18:0/20:3)	11,0 ± 1,8
	875,60	PI (O-18:0/20:2)	8,9 ± 0,6
	865,57	PI (18:0/18:0)	4,6 ± 1,4
<b>CL</b>			
	1430	CL(16:0/18:1_18:1/18:1) CL(16:1/18:0_18:1/18:1)	46,6 ± 1,7
	1456,02	CL (18:1/18:1/18:118:1)	39,4 ± 0,9
<b>PG</b>			
	819,59	PG (18:1/22:6)	16,3 ± 4,2
	799,55	PG (18:1/20:2)	13,6 ± 0,3
	771,52	PG (18:1/18:2)	11,7 ± 2,7
	801,55	PG (18:1/20:1)	5,5 ± 2,8
<b>SM</b>			
	789,61	SM (d18:1/18:0)	18,4 ± 1,9

Tableau 16 : Espèces lipidiques uniquement retrouvées chez les J774

### 3.3.2.2 THP1

26 espèces sont spécifiques des THP1 avec une majorité de PL (17 espèces moléculaires : 4 PC, 3 PI, 5 PE, 2 CL, 2 PG et 1 PA) et 9 sphingolipides (2 SM et 7 hexosylcéramides) (Tableau 17). Aucune PS n'est caractéristique des THP1 dans les profils observés.

Quatre ions de PC sont spécifiques pour ce groupe. Ce sont principalement des diacyl-PC (3 ions) comprenant des AGS ( $m/z$  736,51) ou AGMI  $m/z$  762,58 et 874,65. Le seul éther-PC spécifique des THP1 est un alkyl-PC possédant des AGS et AGMI. Les intensités de ces espèces s'échelonnent de 2,0 % pour  $m/z$  874,65 jusqu'à 10 % pour  $m/z$  762,58. Les trois PI sont des diacyl-PI comprenant des AGS ou AGMI ayant des intensités de l'ordre de 20 %. Un alkyl-PI comprenant un AGPI est observé et correspond à  $m/z$  867,54, l'abondance de ce PL représente 5 %.

Les PE spécifiques des THP1 sont principalement des diacyl-PE avec des AGS et/ou des AGMI ( $m/z$  688,90 ; 718,53) ou comprenant des AGPI en position *sn2* ( $m/z$  790,54 et 792,55). Un plasmalogène ( $m/z$  720,50) ; PE (P-16:0/20:5) est une espèce moléculaire comprenant de l'EPA (C20:5). Deux PG sont spécifiques des THP1 possédant des AGS et représentant 10 % pour l'ion  $m/z$  721,50 et moins de 2 % pour l'ion  $m/z$  693,47. Les CL spécifiques des THP1 comprennent l'ion le plus abondant pour cette lignée ( $m/z$  1373,84) et l'ion  $m/z$  1455,94 représentant 14 %.

Pour les sphingolipides, deux SM sont caractéristiques des THP1 qui représentent moins de 5 % de l'ion majoritaire et les hexosylcéramides dont le temps de rétention est proche de celui des CL. Ces ions sont ici observés sous forme d'adduits chlorés.

Parmi les 26 ions qui ont été observés uniquement chez les THP1, une majorité de PL présentent des AGS ou des AGMI (13 ions sur 17). Les espèces moléculaires présentant des AGPI sont principalement des PE (3 ions) et un PI. Parmi ces espèces, on observe une équitable répartition entre les éthers lipides et les diacyl-PL. La principale originalité des profils lipidiques des THP1 est caractérisée par la présence de 7 espèces d'hexosylcéramides.

Classe lipidique	m/z	Identification	% de l'ion majoritaire ± écart type
<b>Phospholipides</b>			
<b>PC</b>			
	762,58	PC (14:0/16:1) PC (14:1/16:0)	10,1 ± 4,1
	780,57	PC (O-16:0/18:1) PC (O-18:0/16:1)	8,7 ± 0,3
	736,51	PC (14:0/14:0)	4,0 ± 0,4
	874,65	PC (16:0/22:1)	2,0 ± 0,5
<b>PE</b>			
	688,90	PE (16:0/16:1)	36,3 ± 1,2
	790,54	PE (18:0/22:6) PE (18:1/22:5)	27,0 ± 9,1
	792,55	PE (18:0/22:5)	19,4 ± 4,7
	720,50	PE (P-16:0/20:5)	18,6 ± 2,9
	718,53	PE (16:1/18:0) PE (16:0/18:1)	4,6 ± 0,3
<b>PI</b>			
	807,50	PI (16:0/16:1) PI (14:0/18:1)	20,9 ± 1,3
	809,52	PI (16:0/16:0)	18,6 ± 1,8
	867,54	PI (O-16:0/22:6)	5,3 ± 1,1
<b>CL</b>			
	1373,84	CL(14:0/18:1_16:1/18:1) CL(16:0/16:1_16:1/18:1)	100
	1455,94	CL(18:1/18:1/18:1/18:1)	14,1 ± 0,5
<b>PA</b>			
	673,48	PA (16 :0/18 :1)	17,8 ± 4,8
<b>PG</b>			
	693,47	PG (14:0/16:0)	1,8 ± 0,8
	721,50	PG (16:0/16:0)	10,5 ± 2,4
<b>Sphingolipides</b>			
<b>Sphingomyélines</b>			
	759,57	SM (d18:2/16:0)	3,2 ± 0,2
	875,72	SM (d18:0/24:0)	1,9 ± 0,01
<b>Hexosylcéramides</b>			
	1170,76	Trihexosylcéramide (d18:1/24:0)	100
	1058,64	Trihexosylcéramide (d18:1/16:0)	53,7 ± 15,4
	1172,77;	Trihexosylcéramide (d18:0/24:0)	44,2 ± 5,2
	1142,73	Trihexosylcéramide(d18:1/22:0)	27,7 ± 2,0
	1168,75	Trihexosylcéramide (d18:1/24:1)	18,2 ± 4,6
	1008,71	Dihexosylcéramide (d18:1/24:0)	13,9 ± 6,1
	1022,66	Dihexosylcéramide (d18:1/24:1)	10,1 ± 3,7

Tableau 17 : Espèces lipidiques uniquement retrouvées chez les THP1

### 3.3.2.3 HMDM

Le Tableau 18 présente 29 espèces spécifiques des HMDM qui présentent aussi une majorité de PL 22 ions (7 PC, 4 PI, 3 PE, 3 CL, 2 PS, 2 PG et 1 PA) et 7 sphingolipides (2 SM et 5 GM3). Pour les classes phospholipidiques PC, PI, PE et PS, les PL caractéristiques des macrophages humains présentent une majorité d'espèces moléculaires ayant des AGPI.

Parmi ces quatre classes, la PC présente un nombre important de PL contenant de l'acide arachidonique (AA) comme les ions  $m/z$  866,59 ; 840,58 ; 824,58 ; 894,61 ou acide dihomog- $\gamma$ -linoléique (DGLA) comme les ions  $m/z$  842,59 et 870,62. Ces ions présentent une intensité qui s'échelonne entre 5 et 18 %. Pour les PE, deux alkyls-PE ont été identifiés et correspondent aux ions  $m/z$  772,53 et  $m/z$  700,53 dont les intensités sont de l'ordre de 20 %. L'ion  $m/z$  768,55 est un diacyl-PE dont l'abondance est de 10 %. Pour les PI, on dénombre quatre espèces caractéristiques, qui se répartissent équitablement entre plasmalogènes et diacyl-PI. Ces derniers sont les plus intenses ( $m/z$  909,55 et 913,58). Pour les plasmalogènes, ces ions ont une faible intensité : 1,2 % pour  $m/z$  895,57 et moins de 1 % pour l'ion  $m/z$  899,60.

Les HMDM présente deux espèces de PS caractéristiques, c'est le seul type de macrophages présentant cette caractéristique. Deux espèces moléculaires comprenant des AGPI ont été observées comme  $m/z$  838,56 et 840,57. Ces molécules sont minoritaires puisqu'elles représentent moins de 5 %. Deux espèces de PG sont caractéristiques. Ces espèces moléculaires comprennent des AGPI et même doublement polyinsaturés comme l'ion  $m/z$  865,50. Ces ions sont, à la différence des PS, majoritaires parmi les espèces moléculaires de PG. Les CL présentent trois ions caractéristiques avec des intensités relatives s'échelonnant entre 80 % pour l'ion  $m/z$  1423,96 et 30 % pour l'ion  $m/z$  1475,99. Ces trois espèces ont une moitié de PA commune, (PA (18:1/18:2)). L'autre partie est constituée par un mélange d'AG constitué par l'association d'acide palmitoléique (C16:1), de DGLA (C20:3) et d'acide linoléique (C18:2).

Sept sphingolipides sont caractéristiques des HMDM. Comme précédemment, peu d'espèces de SM sont caractéristiques, (deux espèces avec une abondance inférieure à 5 %). Les profils de HMDM montrent une grande diversité en GM3. Comme pour les hexosylcéramides, ces espèces n'ont pas été comptabilisées dans la quantification Corona, pour les raisons qui ont été évoquées précédemment. Parmi les espèces identifiées, on observe une majorité de GM3 avec un radical sphingosine (d18:1) et deux avec un radical sphinganine (d18:0). L'espèce majoritaire des GM3 est aussi présente chez les THP1. Cinq espèces caractéristiques sont observées avec notamment une espèce présentant un AG impair.

Classe phospholipidique	m/z	Identification	% de l'ion majoritaire ± écart type
<b>Phospholipides</b>			
<b>PC</b>			
	866,59	PC (18:1/20:4)	18,6 ± 7,5
	840,58	PC (16:0/20:4)	17,9 ± 5,3
	842,59	PC (16:0/20:3) PC (18:1/18:2)	14,6 ± 0,7
	892,60	PC (18:0/22:6) PC (18:1/22:5)	8,9 ± 0,6
	824,58	PC (P-16:0/20:4)	8,3 ± 3,0
	894,61	PC (20:1/20:4) PC (18:1/22:4) PC (18:0/22:5)	6,6 ± 0,3
	870,62	PC (18:0/20:3) PC (18:1/20:2)	5,5 ± 2,7
<b>PE</b>			
	772,53	PE (O-18:2/22:6)	22,9 ± 2,8
	700,53	PE (O-18:2/16:0)	21,8 ± 4,7
	768,55	PE (18:0/20:3) PE (18:1/20:2)	10,5 ± 2,6
<b>PI</b>			
	909,55	PI (18:0/22:6) PI (18:1/22:5)	17,7 ± 0,6
	913,58	PI (18:0/22:4)	9,5 ± 1,3
	895,57	PI (P-18:0/22:5)	1,2 ± 0,7
	899,60	PI (P-18:0/22:3)	0,6 ± 0,3
<b>PS</b>			
	838,56	PS (18:0/22:4)	5,0 ± 2,1
	840,57	PS (18:0/22:3)	0,9 ± 0,5
<b>CL</b>			
	1423,96	CL (18:1/18:2_16:1/18:2)	83,7 ± 13,0
	1449,98	CL (18:1/18:2_18:2/18:2)	66,9 ± 1,6
	1475,99	CL (18:1/18:2_18:2/20:3)	31,2 ± 3,8
<b>PG</b>			
	865,50	PG (22:6/22:6)	100
	821,53	PG (18:1/22:5)	78,1 ± 4,8
<b>PA</b>			
	701,48	PA (16:0/18:1)	56,0 ± 1,3
<b>Sphingolipides</b>			
<b>Sphingomyélines</b>			
	733,55	SM (d18:1/14:0)	2,3 ± 0,3
	869,67	SM (d18:2/24:1)	5,4 ± 0,6
<b>Gangliosides</b>			
	1151,71	GM3 (d18:1/16:0)	63,6 ± 10,8
	1235,80	GM3 (d18:1/22:0)	22,3 ± 3,0
	1153,71	GM3 (d18:0/16:0)	21,6 ± 0,5
	1265,84	GM3 (d18:0/24:0)	18,9 ± 7,7
	1249,82	GM3 (d18:1/23:0)	7,7 ± 0,3

Tableau 18 : Espèces lipidiques uniquement retrouvées chez les HMDM

Pour les trois types de macrophages le nombre d'espèces lipidiques caractéristiques est variable. En effet, le nombre de lipides est de 21 pour les J774, 26 pour les THP1 et 29 pour les HMDM. Pour le J774, les espèces caractéristiques sont principalement observées au niveau des PG et des éthers lipidiques de PI, PE et PC. Pour les THP1, la présence d'hexosylcéramide et de PL possédant une faible proportion d'AGPI est caractéristique de la lignée. Enfin, les HMDM présentent une majorité d'espèces moléculaires caractéristiques possédant des acides gras polyinsaturés au niveau des PL et une population d'espèces de GM3 singulière. Ainsi les 165 ions identifiés se répartissent en 54 ions communs et 76 ions spécifiques. Les 35 ions restant ont été observés uniquement chez deux lignées de macrophages, ainsi trois groupes d'espèces sont définis.

### 3.3.3 Espèces lipidiques présentes chez deux types de macrophages

#### 3.3.3.1 J774 et THP1

22 ions sont exclusivement présents chez les THP1 et les J774, ils se répartissent en 6 PC, 4 PE, 4 PG, 3 PI, 3 CL et 2 PG (Tableau 19).

Les PC identifiées dans cette catégorie sont exclusivement des éthers-PC. Parmi ces ions, il existe une part importante d'ions composés d'AGS ( $m/z$  778,59), d'AGMI ou comprenant de l'acide linoléique (C18:2) ( $m/z$  802,59 ; 804,61 ; 832,64) et sont plus fortement exprimées chez les J774. Les composés ayant des AGPI sont aussi sous forme d'éthers-PC avec des quantités beaucoup plus modestes mais toujours plus fortement exprimées chez les J774 ( $m/z$  828,56 : 6,1 % pour les J774 contre 1,3 % chez les THP1 et pour l'ion  $m/z$  850,59 5,2 % pour les J774 et seulement 1,9 % pour les THP1).

Les PE de ce groupe présentent les mêmes caractéristiques que les ions de PC précédemment cités mais les abondances sont comparables entre les J774 et THP1. Le seul diacyl-PE est l'ion  $m/z$  714,51. Les extraits de J774 présentent pour cet ion une quantité plus importante (30 %) par rapport aux THP1 (15,7 %). Trois espèces de PI sont aussi présentes uniquement chez les J774 et THP1. Ces espèces sont principalement des alkyls-PI comprenant un acide arachidonique. L'ion  $m/z$  871,57 ; PI (O-18:0/20:4) a une abondance comparable entre les J774 et les THP1, tandis que l'ion  $m/z$  843,54 est plus représenté chez les THP1.

Concernant les PG, seuls quatre ions sont observés dans ces deux extraits de macrophages. Qualitativement ce sont principalement des PG présentant uniquement des AGS ( $m/z$  749,53) ou

AGMI monoinsaturés pour les trois autres. Deux ions ne présentent pas de différences  $m/z$  745,56 et 775,59. Concernant les ions  $m/z$  719,49 et 749,53, les abondances relatives sont plus importantes pour les THP1.

Enfin, trois CL sont présentes chez les J774 et les THP1. Les ions  $m/z$  1371,83 et  $m/z$  1401,98 présentent des intensités comparables entre les deux lignées tandis que l'ion  $m/z$  1427,99 est l'ion majoritaire des CL pour les J774 et largement exprimé pour les THP1.

Classes phospholipidiques	$m/z$	Identification	J774	THP1
<b>PC</b>				
	778,59	PC (O-16:0/16:0) PC (O-18:0/14:0)	40,0 ± 12,3	4,0 ± 1,0
	802,59	PC (P-18:0/16:1) PC (O-16:0/18:2) PC (P-16:0/18:1)	14,2 ± 3,4	4,8 ± 0,2
	850,59	PC (P-18:0/20:5) PC (O-16:0/22:6)	5,2 ± 2,2	1,9 ± 0,3
	804,61	PC (O-16:0/18:1) PC (O-18:0/16:1)	88,9 ± 11,2	30,2 ± 1,3
	828,56	PC (O-16:0/20:3)	6,1 ± 1,5	1,3 ± 0,3
	832,64	PC (O-18:0/18:1) PC (O-16:0/20:1)	19,4 ± 0,7	2,2 ± 0,6
<b>PE</b>				
	672,5	PE (P-16:0/16:1)	34,8 ± 9,2	49,1 ± 4,0
	698,51	PE (P-16:0/18:2)	36,5 ± 8,8	28,1 ± 0,2
	728,56	PE (P-16:0/20:1) PE (P-18:0/18:1)	23,8 ± 4,9	15,8 ± 1,9
	714,51	PE (16:1/18:1) PE (16:0/18:2)	30,0 ± 4,9	15,7 ± 1,1
<b>PI</b>				
	837,54	PI (16:0/18:0)	2,4 ± 0,5	15,7 ± 1,3
	843,54	PI (O-16:0/20:4)	2,4 ± 0,9	12,1 ± 1,7
	871,57	PI (O-18:0/20:4)	9,6 ± 2,6	8,0 ± 0,4
<b>PS</b>				
	732,48	PS (16:1/16:0)	18,1 ± 3,9	17,1 ± 3,4
	758,58	PS (16:1/18:1) PS (16:0/18:2)	18,6 ± 1,5	8,0 ± 3,4
<b>CL</b>				
	1371,83	CL (16:1/16:1_16:1/18:1) CL (14:0/18:2_16:1/18:1)	26,8 ± 1,7	23,2 ± 0,4
	1401,98	CL (16:1/18:1_16:0/18:1) CL (16:1/18:1_16:1/18:0)	44,1 ± 6,0	39,5 ± 4,5
	1427,99	CL (16:1/18:1_18:1/18:1)	100	78,3 ± 9,8
<b>PG</b>				
	749,53	PG (16:0/18:0)	1,1 ± 0,6	10,2 ± 1,2
	719,49	PG (16:0/16:1)	1,1 ± 0,7	5,5 ± 0,2
	745,56	PG (16:1/18:1)	13,4 ± 0,2	7,3 ± 1,2
	775,59	PG (18:0/18:1)	17,9 ± 5,9	13,1 ± 7,4

Tableau 19 : Espèces phospholipidiques uniquement présentes dans les extraits de macrophages J774 et THP1

### 3.3.3.2 THP1 et HMDM

Seulement 7 ions sont retrouvés à la fois chez les THP1 et chez les HMDM (Tableau 20). Ce sont principalement des éthers-PE avec des AGPI. Les ions  $m/z$  750,54 et 778,57 présentent des

abondances plus importantes chez les HMDM, au contraire l'ion  $m/z$  752,54 est plus fortement exprimé chez les THP1.

Par ailleurs, l'ion  $m/z$  762,52 correspondant à une PS avec des AGS est absent des extraits lipidiques de J774. Cette espèce présente une abondance de 10 % chez les THP1 et de 4,5 % pour les HMDM. Enfin trois SM sont caractéristiques de ces types de macrophages et présentent des abondances relatives différentes.

Classes lipidiques	$m/z$	Identification	THP1	HMDM
<b>PE</b>				
	750,54	PE (P-18:0/20:4) PE (P-16:0/22:4)	34,6 ± 3,6	55,2 ± 2,8
	752,54 ;	PE (O-18:0/20:4) PE (P-18:0/20:3)	13,6 ± 0,3	5,8 ± 2,2
	778,57	PE (O-18:0/22:5) PE (P-20:0/20:4) PE (P-18:0/22:4)	4,1 ± 0,2	10,4 ± 0,6
<b>PS</b>				
	762,52	PS (16:0/18:0)	9,1 ± 0,9	4,5 ± 1,2
<b>Sphingolipides</b>				
	847,64	SM (d18:0/22:0)	5,5 ± 0,4	10,8 ± 2,4
	1261,82	GM3 (d18:1/24:1)	100	85,6 ± 11,7
	1263,83	GM3 (d18:1/24:0)	8,6 ± 4,7	100

Tableau 20 : Espèces lipidiques uniquement présentes dans les extraits de macrophages THP1 et HMDM

### 3.3.3.3 J774 et HMDM

Six espèces de PL appartiennent à ce groupe (3 PS, 1 PE, 1 PI et 1 CL). Ce sont principalement des diacyl-PL excepté pour l'ion  $m/z$  897,58. La majorité des espèces moléculaires comportent des AGPI et présentent des abondances différentes entre les J774 et les HMDM (Tableau 21).

Classe phospholipidiques	m/z	Identification	J774	HMDM
<b>PE</b>	766,54	PE (18:0/20:4) PE (18:1/20:3)	26,8 ± 1,7	93,89 ± 0,63
<b>PI</b>	897,58	PI (O-18:0/22:5) PI (P-18:0/22:4)	2,9 ± 0,24	1,3 ± 0,6
<b>PS</b>	810,53	PS (18:0/20:4) PS (18:1/20:3)	16,3 ± 3,2	11,0 ± 4,5
	812,54	PS (18:0/20:3)	35,8 ± 11,3	7,3 ± 1,4
	814,56	PS (18:0/20:2) PS (18:1/20:1)	32,4 ± 6,6	2,7 ± 0,9
<b>CL</b>	1478	CL (18:1/18:2_18:1/20:3)	3,9 ± 1,3	20,6 ± 1,6

Tableau 21 : Espèces phospholipidiques uniquement présentes dans les extraits de macrophages J774 et HMDM

## 4 Discussion et conclusion

Ce travail avait pour objectif de présenter une comparaison de la composition phospholipidique de trois types de macrophages les plus souvent retrouvés dans la littérature.

Dans un premier temps, l'analyse des AG méthylés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée pour déterminer les proportions relatives des différents AG des PL. Cette analyse a nécessité tout d'abord de séparer les PL des autres classes lipidiques au moyen d'une méthode d'extraction en phase solide. Cette méthode de purification a été évaluée avec une méthode de NP-LC avec une détection à aérosol chargé ou Corona. Les différentes fractions récoltées ont montré que les PL étaient bien récupérés et surtout qu'il n'existait pas d'interférences avec les lipides neutres. Puis, l'analyse d'un mélange complexe d'AG méthylés a révélé que la source d'ionisation à impact électronique fournissait des spectres de masse difficilement interprétables notamment pour les AGPI. Ainsi, l'ionisation chimique reconnue pour être plus douce a permis d'identifier les AGPI grâce aux adduits dérivés du méthane et de l'ion moléculaire. Les temps de rétention et les éventuelles coélutions ont pu être détectés lors des premiers essais. La mise au point de la méthode a rendu possible la séparation de la plupart des différents composés mais une fenêtre de détection SIM a été ajoutée afin de séparer un dérivé du DGLA (C20:3) de l'acide arachidonique (C20:4). La technique de GC-MS mise en place au sein du SAMM a été utilisée pour déterminer les proportions d'AG méthylés des échantillons biologiques. Les résultats obtenus montrent que les macrophages de Souris J774 sont les plus riches en AGMI, que les THP1 sont les plus riches en AGS tandis que les macrophages humains sont les plus riches en AGPI. L'objectif de cette méthode est de fournir une vision globale de la composition des AG membranaires afin de déterminer s'il existe des

différences importantes entre les différents types de macrophages et d'orienter l'interprétation des données LC-MS. De plus, le protocole choisi est adapté à l'analyse d'autres fractions lipidiques comme notamment la composition des AG des lipides neutres. En effet, la méthode *trans*-estérification en milieu acide permet la synthèse d'AG méthylés pour l'ensemble des classes lipidiques.

La technique de chromatographie liquide utilisée représente une méthode adaptée dans le contexte de l'étude. En effet, la séparation par NP-LC permet non seulement de déterminer les proportions des classes phospholipidiques mais aussi d'élucider la structure des espèces moléculaires grâce à son couplage avec la spectrométrie de masse ultra-haute résolution. Le caractère universel du détecteur Corona et la spécificité de la détection en spectrométrie de masse ont été mises à profit au cours de cette étude. En effet, des coélutions ont été mises en évidence grâce à l'identification des composés en spectrométrie de masse.

La composition des PL membranaires des différents types de macrophages ne présente pas de différence majeure concernant les principales classes de PL. Même si la quantité de biomasse recueillie pour les macrophages issus de lignées était plus importante, il faut cependant noter une augmentation des proportions de SM au sein des HMDM. Cela pourrait être mis en relation avec l'augmentation des AGPI, afin de maintenir la structure de la bicouche lipidique et de conserver ses propriétés physico-chimiques notamment au niveau de la fluidité membranaire.

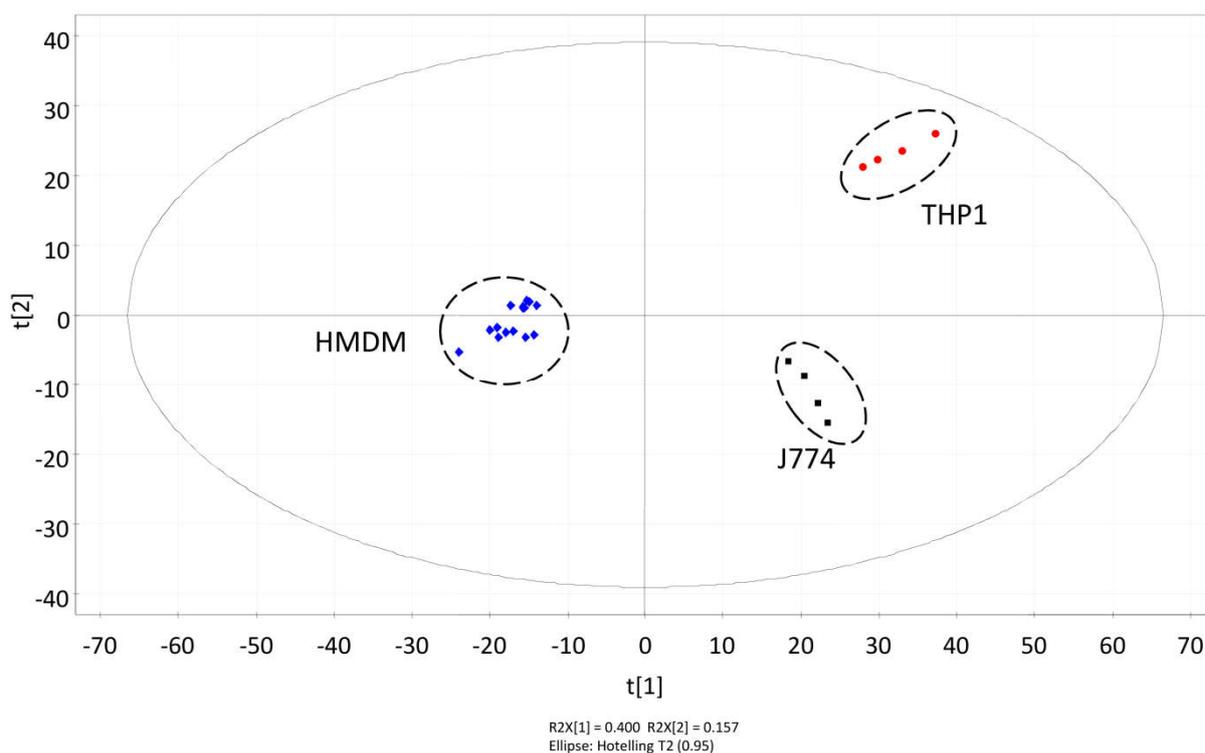
L'étude de la composition des PL par NP-LC-LTQ-Orbitrap a permis de définir qualitativement et quantitativement la composition des PL membranaires de trois types de macrophages. Ainsi, 165 ions identifiés ont été répartis en trois groupes afin de présenter une étude comparative. Au total l'ensemble de trois types de macrophages présente globalement le même nombre d'ions observés, proche de 100 (96 ions pour les HMDM, 103 pour les J774 et 109 pour les THP1). La moitié de ces ions sont communs aux trois types de cellules (49,5 % pour les THP1 52,4 pour les J774 et 56,2 pour les HMDM) mais on observe des différences quantitatives. Ceci est particulièrement vrai pour les ions majoritaires de chaque classe phospholipidique. On peut distinguer les PC, PS et SM qui ont le même ion majoritaire pour les trois types de macrophages. Au contraire, les PE, PI, CL et PG qui ont un ion majoritaire différent entre les macrophages. Qualitativement, l'ion majoritaire pour les HMDM présente un AGPI pour les PE, PI et PG. Les espèces moléculaires communes aux trois types de macrophages sont principalement des PL contenant des AGS ou AGMI pour les PC, AGPI pour les PE et PI, et équitablement répartis entre AGS, AGMI et AGPI pour les PS.

Le deuxième groupe défini est celui des ions spécifiquement retrouvés pour un type de macrophages. Ces espèces moléculaires représentent pour les lignées autour de 20 % de la totalité des

ions identifiés (J774 : 20,4 % et THP1 : 23,8 %). Il est cependant intéressant de relever que ce pourcentage est plus élevé pour les HMDM (30 % des ions identifiables sur les 96). Ces ions sont pour une part importante des PL comprenant des AGPI pour les PC, PI, PE, PS et PG. Concernant les J774 et les THP1, les espèces spécifiques sont principalement des éthers-PL de PI, PE et PC. La répartition des AG de ces classes est équitable entre les différents types d'AG. La différence majeure entre les ions spécifiques de chaque type de macrophages est la composition des sphingolipides. En effet, les HMDM ont une quantité non négligeable de ganglioside (5 espèces spécifiques et 2 identifiées dans les HMDM et THP1), les THP1 présentent un nombre important d'héxosylcéramide. Ces molécules ne sont pas observées chez les macrophages de Souris J774.

Concernant les ions qui ont été retrouvés uniquement chez deux types de macrophages, le groupe THP1 et J774 présente le nombre d'ions le plus important (22 ions). Ce sont principalement des éthers-PL de PC, PI et PE comprenant en majorité des AGS et AGMI. Les deux autres groupes (ions partagés par HMDM et THP1 ; HMDM et J774) possèdent beaucoup moins d'ions et correspondent respectivement à 4,24 % et 3,63 % des ions identifiés. Ainsi, les THP1 et les J774 partagent près de 70 % des phospholipides identifiées (70 % et 74 % respectivement).

Nous avons tenté d'illustrer cela en créant une matrice à l'aide du logiciel Mzmine, pour traiter ces données avec une analyse en composantes principales et une PLS-DA. Le tracé des scores de la PLS-DA est présenté dans la Figure 63. Une tolérance plus large a été accordée au temps de rétention puisque l'analyse des HMDM et celles des lignées ont été différées dans le temps. Néanmoins, on observe que la première composante permet de séparer les cellules des lignées des HMDM, elle représente 40 % de la variance. La deuxième composante permet de séparer les THP1 des macrophages de Souris J774, la part de variance expliquée pour cette composante est de 16 %. Ainsi, cette figure illustre bien les observations effectuées précédemment. En effet, la composition phospholipidique des HMDM représente la première part de variance. Les différences de composition entre les J774 et les THP1 sont plus faibles et représentent la deuxième part de variance.



**Figure 63 : Analyses en composante principale des données NP-LC-LTQ-Orbitrap™ des extraits de macrophages HMDM, THP1 et J774**

La principale réserve à émettre est que la liste des ions identifiés n'est pas forcément exhaustive. L'ensemble des échantillons ont été analysés selon un mode d'acquisition particulier. En effet, le spectromètre LTQ-Orbitrap™ fonctionne en mode data dépendant. C'est-à-dire que la double trappe linéaire procède à la fragmentation des ions suivant un mode d'exclusion dynamique. Ainsi les 5 ions les plus intenses du spectre Full-Scan sont fragmentés selon le mode « collision induced dissociation » ou CID. Le seuil fixé est de  $1,0E+05$  pour déclencher une fragmentation des ions ( $MS^2$ ). Puis, les deux ions les plus intenses du spectre  $MS^2$  sont fragmentés avec un seuil fixé à 500. La fragmentation des 5 ions les plus intenses est réalisée trois fois sur une plage de 30 secondes. Ils sont ensuite ignorés pendant 15 secondes pour passer aux 5 suivants. Ce mode d'acquisition est particulièrement adapté pour réaliser un grand nombre de fragmentations afin de procéder à l'identification d'un maximum d'ions dans un mélange biologique. Il est néanmoins fort probable que certains ions, dont l'abondance ne déclenche pas les seuils de fragmentation, n'aie pas pu être identifiés dans cette étude. Il est donc difficile de prétendre que la composition de chaque type d'échantillon est exhaustive. Les ions minoritaires ne sont pas identifiables dans les profils obtenus.

Cette étude se propose de créer une base de données des espèces phospholipidiques contenues dans différents types de macrophages. Cette cartographie peut être utilisée de différentes manières. La plupart du temps, l'objectif des analyses lipidomiques est de déterminer quelles modifications de composition sont observables entre deux groupes d'échantillons grâce à l'analyse de données

multivariées. Les techniques chimiométriques construisent un modèle mathématique capable de distinguer les différents groupes d'échantillons et d'obtenir des informations sur les variables responsables de ces différences. Cette base de données des PL de macrophages peut être utilisée en complément des analyses chimiométriques afin de connaître les PL qui ne sont pas modifiés entre les deux groupes. En effet, cette information est rarement disponible, puisqu'il est particulièrement long et fastidieux de procéder à l'identification de l'ensemble des métabolites. Connaître les métabolites non modifiés peut être informatif pour exclure certaines hypothèses.

Enfin, établir cette composition globale pourrait éventuellement servir d'argument afin d'éviter d'utiliser les macrophages humains. En effet, ces cellules sont plus physiologiques mais leur utilisation est soumise à de nombreuses contraintes (temps de culture cellulaire, volume de sang total à prélever, variabilité de la réponse cellulaire en fonction du donneur). Les lignées de macrophages sont au contraire très simples à obtenir, le temps de culture est court et ces cellules sont douées d'une capacité de division intense.



**Chapitre 5 : Etude de l'impact de  
l'incorporation d'acide gras  $\omega$ 3 sur les  
phospholipides de macrophages humains et  
mise en relation avec la diminution d'efflux  
du cholestérol**

# 1 Introduction

La composition des plaques d'athérosclérose présentes dans les artères de gros et moyen calibre, varie au cours du temps mais une caractéristique commune à toutes les plaques est la présence d'un cœur lipidique correspondant à l'accumulation de cellules spumeuses qui sont des macrophages gorgés de cholestérol. La seule possibilité qu'ont ces cellules de se débarrasser de ce cholestérol est de le céder à un accepteur extracellulaire que sont les HDL ou les pré $\beta$ -HDL. Il s'agit de l'efflux du cholestérol libre qui est la première étape du transport inverse du cholestérol qui assure le retour du cholestérol en excès des cellules des tissus périphériques vers le foie, seul organe capable de l'éliminer.

Parmi les différents mécanismes permettant la sortie du cholestérol, le transporteur ATP binding cassette A1 (ABCA1) est physiologiquement le plus important. Le déficit de cette protéine membranaire est responsable de la maladie de Tangier caractérisée notamment par l'apparition précoce de lésions d'athérosclérose et une concentration effondrée des HDL circulantes. Comme toute protéine présente dans la membrane plasmique, la fonctionnalité de l'ABCA1 dépend des propriétés de la membrane dans laquelle il est inséré et notamment de la composition des PL. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que la modification de la composition en acides gras des PL membranaires des macrophages puisse modifier le fonctionnement de l'ABCA1 et ainsi impacter les capacités d'efflux du cholestérol de ces cellules. En effet, nous avons récemment démontré que l'incorporation d'acide gras *trans* diminue le fonctionnement de l'ABCA1<sup>275</sup>. Plus récemment, d'autres travaux de notre équipe ont rapporté que l'addition d'EPA (C20:5) dans des cultures de macrophages humains (HMDM : Human Monocyte-Derived Macrophage) diminuait les capacités d'efflux du cholestérol par un mécanisme impliquant les protéines kinases A (PKA)<sup>282</sup>.

Dans ces études, les modifications de composition des phospholipides membranaires ont été appréciées grâce à une technique de chromatographie en phase gazeuse (GC). Cette technique permet l'analyse des AG membranaires après une réaction de *trans*-estérification. Cette réaction consiste à détruire les phospholipides natifs pour générer des AG méthylés, composés suffisamment volatils pour être analysés par GC. L'utilisation de cette méthode permet d'observer une modification relative des profils d'AG mais ne permet pas de déterminer la nature et la classe des PL impactés par cet ajout chronique d'EPA dans les cultures de macrophages.

Dans ce travail, nous avons donc utilisé des techniques de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permettant d'effectuer une comparaison des profils phospholipidiques obtenus et de caractériser les espèces moléculaires responsables des différences de comportement

entre les groupes d'échantillons. Notre objectif est d'établir et de comparer les profils lipidiques détaillés (« signature lipidique ») obtenus dans les différentes conditions expérimentales (HMDM supplémentés ou non en EPA) puis de les mettre en relation avec les modifications d'efflux observées afin de mettre en évidence l'existence potentielle d'une relation phospholipidome-fonction.

## **2 Matériel et méthodes**

### **2.1 Culture cellulaire et mesure de l'efflux du cholestérol**

Les monocytes ont été isolés à partir de sang total issu de 11 patients normolipidémiques (Etablissement français du sang) par gradient de Ficoll puis différenciés en macrophages par adhésion sur support plastique Primaria® 24 puits durant une période de 11 jours dans un milieu de culture composé de RPMI 1640 auquel sont ajoutés 10 % de sérum de veau foetal, des antibiotiques et 20 ng.ml<sup>-1</sup> de hM-CSF (human macrophage-colony stimulating factor). Tous les composés utilisés sont dépourvus d'endotoxine.

Pour étudier les effets des modifications membranaires dues à l'addition d'EPA (acide eicosapentaénoïque), les macrophages humains sont incubés pendant 34 heures dans le milieu de culture avec 70 µmol.L<sup>-1</sup> d'EPA (Cayman, Chemical Company, Ann Harbor, MI) liés à de l'albumine bovine (groupe EPA ou EPA). Les cellules servant de témoins sont incubées dans le milieu de culture non supplémenté en EPA (groupe Témoins ou T).

L'efflux isotopique est mesuré en marquant les pools de cholestérol par addition de cholestérol tritié (1µCi/puits) au milieu expérimental supplémenté ou non en AG. Les cellules sont ensuite incubées 16 heures dans du milieu sans sérum contenant 0,2 % d'albumine bovine et des agonistes LXR/RXR (5 µg/ml de 22-hydroxy-cholestérol et 10 µM d'acide rétinolique) afin d'induire la surexpression de l'ABCA1. Après cette période d'équilibration, l'efflux est mesuré 4 heures après l'addition d'apoAI (15 µg/ml) comme accepteur de cholestérol.

## **2.2 Réactifs**

### **2.2.1 Standards**

Les standards de PL utilisés pour les analyses de chromatographie liquide proviennent de chez Sigma-Aldrich® (Saint-Quentin-Fallavier, France) : diphosphatidylglycérol ou cardiolipine (CL), glycérophosphatidylinositol (PI) (extrait de foie de bovin), L- $\alpha$ -glycérophosphatidyléthanolamine (PE), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC), L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine (LPC) (extrait de jaune d'œuf), L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-sérine (PS) et sphingomyéline (SM) (extrait de cerveau de bovin). Les standards ont été préparés à la concentration initiale de 0,5 g.L<sup>-1</sup> dans un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1 ; v/v). Tous les analytes ont été conservés à une température de -20°C.

Pour les analyses GC-MS, un mélange de 37 AG méthylés (Supelco®) et du méthyle nonadécanoate (C19:0) ont été fournis par Sigma-Aldrich® (Saint-Quentin-Fallavier, France).

### 2.2.2 Solvants

Les solvants utilisés pour les extractions et les analyses chromatographiques sont le *n*-heptane, le 2-propanol, le chloroforme, le méthanol et l'eau. Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC et obtenus chez VWR international®. La triéthylamine (99 %) et l'acide acétique glacial ont été ajoutés dans toutes les phases mobiles (Sigma Aldrich®, Saint-Quentin-Fallavier, France).

## 2.3 Extraction des lipides et préparation des acides gras méthylés

L'extraction des lipides a été réalisée en utilisant un dérivé de la méthode de Folch<sup>40</sup>. Chaque puits de culture contenant les HMDM a été rincé deux fois avec du tampon avant l'addition de 300  $\mu$ L d'eau désionisée. Chaque plaque de culture cellulaire a été congelée à -20°C puis décongelée à température ambiante. Sept mL d'un mélange de chloroforme/méthanol (2 : 1 ; v/v) ont été ajoutés à la suspension cellulaire obtenue. Les extraits lipidiques ont été recueillis dans la phase chloroformique après une centrifugation à 1000 *g* pendant 10 minutes à température ambiante. Les résidus lipidiques ont été évaporés à sec puis reconstitués avec 300  $\mu$ L d'un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1 ; v/v). La population d'échantillons analysés est constituée de 11 échantillons par groupe (T et EPA).

Pour les analyses GC-MS, seule la fraction phospholipidique a été étudiée. Une méthode d'extraction en phase solide a été utilisée basée sur la méthode de Pinkart *et al*<sup>57,311</sup>. Une colonne de 100 mg de phase aminopropyle (Agilent Technologies®, Les Ulis, France) a été activée par 4 mL de *n*-heptane puis un volume d'échantillon de 100  $\mu$ L a été déposé. Les lipides neutres ont été élués par 3 mL de chloroforme, la fraction des AG libres a été élue par 4 mL de diéthyléther/acide acétique

(98 :2 ; v/v). Enfin, les PL ont été élués par 3 mL de méthanol/chloroforme (6 :1 ; v/v) puis par 3 mL de méthanol/chloroforme (6 :1 ; v/v) contenant 0,05 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate de sodium. Les deux dernières fractions ont été collectées, réunies et évaporées à sec. Cinquante µg de méthyle nonadécanoate ont été ajoutés comme étalon interne. La *trans*-estérification a été effectuée par un mélange de 1,6 mL de méthanol et 100 µL de chlorure d'acétyle pendant 25 minutes à 80°C. Après réaction, les AG méthylés ont été extraits par 2 mL de *n*-heptane, évaporés à sec puis repris dans 50 µL de *n*-heptane.

## **2.4 Analyse des acides gras méthylés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**

Les analyses GC/MS ont été effectuées sur Trace GC Ultra gas chromatography équipé d'un injecteur automatique AI3000II couplé avec une trappe ionique ITQ 900 fourni par ThermoFisher Scientific® (Les Ulis, France). La séparation de chromatographie en phase gazeuse a nécessité l'utilisation d'une colonne TraceGold TG-polar (30 m x ID 0,25 mm x film d'épaisseur de 0,2 µm). L'hélium a servi de gaz vecteur avec un débit de 1,3 mL.min<sup>-1</sup>. La température de l'injecteur a été réglée à 230 °C comme la ligne de transfert vers la spectrométrie de masse. Le volume d'injection de l'échantillon est de 1 µL en split (ratio 1:25) et le programme du four a été réglé comme suit: 110 °C maintenus pendant 3 minutes puis une augmentation à 175°C à 6 °C.min<sup>-1</sup>, puis à 185°C à 1 °C.min<sup>-1</sup> et pour finir à 210 °C à 5 °C.min<sup>-1</sup>. Le temps d'acquisition total a été de 26 minutes.

La détection en spectrométrie de masse a été effectuée en utilisant une ionisation chimique en mode positif. La température de la source a été réglée à 200 °C et le méthane a été utilisé comme gaz réactant à un débit de 1,3 mL.min<sup>-1</sup>. La détection en masse a été effectuée en mode Full-Scan avec une gamme de masse allant de *m/z* 40 à 400 avec un délai de solvant de 3 minutes. Chaque AG a été exprimé en pourcentage du total de l'aire des AG identifiés. Le calcul tient compte des facteurs de réponse de chaque AG méthylé obtenus à partir de l'analyse du mélange de 37 AG méthylés (Supelco®). Les données sont exprimées par la moyenne des pourcentages ± SEM (Standard Error of Mean) pour un AG donné. Le nombre d'analyses effectuées pour chacun des groupes est égal à 20 (n=20). Les AG ayant un pourcentage inférieur à 1 % ne sont pas reportés mais sont comptabilisés dans la catégorie « autres ».

## **2.5 Analyse des phospholipides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)**

### **2.5.1 Chromatographie liquide et quantification des classes lipidiques**

La séparation des phospholipides a été effectuée à une température de 35 °C en utilisant une colonne PVA-Sil (150 x 2,1 mm ID, 5 µm) YMC Europe GmbH. Cette méthode de séparation chromatographique a été décrite au cours de travaux antérieurs<sup>82,86,89,253,301,304</sup>. Le débit des effluents chromatographiques a été divisé à 0,25 mL.min<sup>-1</sup> au détecteur Corona, ThermoFisher Scientific® (Les Ulis, France), pour les analyses quantitatives. De l'éthanol a été mélangé aux effluents chromatographiques à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> fourni par une seconde pompe chromatographique. Une série de contrôles a été analysée pour la quantification des classes lipidiques, diluées dans les mêmes conditions que les échantillons biologiques. Ces échantillons ont été dilués pour obtenir des concentrations s'échelonnant de 0,0125 à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. La quantification des classes phospholipidiques a été réalisée sur 15 déterminations pour chaque groupe d'échantillons.

### **2.5.2 Spectrométrie de masse**

Les effluents chromatographiques sont introduits dans le spectromètre LTQ-Orbitrap Velos Pro™, ThermoFisher Scientific® (Les Ulis, France) à un débit de 0,15 mL.min<sup>-1</sup> équipé d'une source Electrospray. Le mode d'ionisation négative a été utilisé pour obtenir des informations structurales sur les espèces moléculaires. Le balayage Full-Scan a été effectué de  $m/z$  300 à 1800 par la cellule Orbitrap™ avec une résolution de 100 000. Simultanément, les fragmentations MS<sup>2</sup>/MS<sup>3</sup> ont été réalisées dans la double trappe linéaire à basse résolution avec une énergie de collision de 35 unités arbitraires.

## **2.6 Traitement des données**

Les échantillons issus des 11 poches de sang sont divisés en deux sets de données. Le premier set « Data Set 1 » ou DS1 est constitué de 14 échantillons (7 T et 7 EPA), issus des 7 premières poches de sang. Le second set (DS2) est constitué de 8 échantillons issus des 4 suivantes (4 T et 4 EPA).

Le DS1 est utilisé pour effectuer les analyses discriminantes et construire le modèle de régression PLS (PLS-R) entre le pourcentage de diminution de l'efflux du cholestérol et l'intensité des variables discriminantes. La prédiction de l'efflux du cholestérol est effectuée avec le DS2.

### 2.6.1 Analyses discriminantes

Après le chargement des fichiers au format « .raw » dans le logiciel Mzmine 2.25, les deux sets de données ont été soumis aux différentes étapes du prétraitement (construction du chromatogramme, alignement et remplissage des données manquantes).

Il en résulte, pour DS1, une matrice de données avec 1832 variables et 28 échantillons. Cette matrice a été utilisée pour effectuer séquentiellement une analyse en composante principale (ACP) pour l'analyse exploratoire des données<sup>243</sup>. Une PLS-DA a été effectuée pour observer les différents groupes d'échantillons<sup>246,247,249</sup>. L'évaluation des différentes composantes de chaque modèle a été effectuée en calculant la variance expliquée ( $R^2$ ) et la capacité de prédiction ( $Q^2$ ).

Afin de déterminer les variables responsables de cette organisation, une correction orthogonale (OSC) a été réalisée pour éliminer les variations qui ne sont pas linéairement corrélées à l'information de classe entre les deux groupes<sup>254</sup>. Les variables discriminantes ont été sélectionnées en utilisant le diagramme de variance-covariance du modèle OSC-PLS-DA. Ces analyses chimiométriques ont été réalisées avec le logiciel SIMCA-P version 12 (Umetrics, Umeå, Suède).

Les ions ont été identifiés en utilisant les données de  $MS^2/MS^3$  obtenues par la trappe linéaire et comparées aux données de [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org). Les PL sont écrits comme suit : PL (18:0/18:2) quand les positions *sn1* et *sn2* des chaînes d'acides gras sont connues. Un test unilatéral de Student avec hypothèse d'hétéroscédasticité des variances a été réalisé sur les moyennes des intensités brutes de chaque groupe pour chaque variable discriminante. Les différences statistiques ont été exprimées comme ceci : \* pour une *p-value* < 0,05, \*\* pour une *p-value* < 0,01 et \*\*\* pour une *p-value* < 0,001.

### 2.6.2 Relation entre la diminution de l'efflux radioisotopique du cholestérol en présence d'EPA et les modifications des profils lipidiques

Pour mettre en évidence les relations qui existent entre ces deux mesures, une PLS-R a été effectuée. L'efflux du cholestérol est calculé en effectuant la différence entre l'efflux en présence

d'ApoA1, ou efflux actif, et la moyenne de l'efflux sans accepteur, ou efflux passif. L'impact de l'EPA sur le niveau de l'efflux du cholestérol ABCA1-dépendant est évalué en calculant le pourcentage de diminution d'efflux entre les cellules T et les cellules EPA. Ce pourcentage représente les variables Y. Les variables X sont les intensités moyennes des différentes variables discriminantes qui sont exprimées de manière analogue à l'expression de l'efflux du cholestérol, les Équation 8 expriment le calcul des variables X et Y.

$$Y_j = 1 - \frac{(\text{Efflux déduit EPA})_j}{(\text{Efflux déduit T})_j}$$

$$X_{i,j} = 1 - \frac{(\text{Intensité de la variable } j \text{ EPA})_i}{(\text{Intensité de la variable } j \text{ T})_i}$$

**Équation 8 : Expression de la variable Y sur la poche j et de la variable X de la poche j pour la variable discriminante i**

En plus du R<sup>2</sup> et Q<sup>2</sup>, les modèles de PLS-R ont été évalués en calculant la RMSEE (Root Mean Square Error of Estimation) pour le DS1 et la RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) pour le DS2, dont les formules sont présentées Équation 9. Ces paramètres permettent d'estimer la qualité de l'ajustement (RMSEE) ou la qualité de la prédiction du modèle de régression (RMSEP).

$$RMSEE = \sqrt{\frac{\sum(Y_{obs\ DS1} - Y_{pred\ DS1})^2}{(N_{DS1} - 1 - A)}}$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum(Y_{obs\ DS2} - Y_{pred\ DS2})^2}{N_{DS2}}}$$

**Y<sub>obs DS1</sub> : valeur de Y observés pour le DS1 ; Y<sub>pred DS1</sub> : Valeur de Y prédits par le modèle pour le DS1; N<sub>DS1</sub> : Nombre d'observation du DS 1 ; A : nombre de composante**

**Y<sub>obs DS2</sub> : valeur de Y observés pour DS2 ; Y<sub>pred DS2</sub> : Valeur de Y prédits par le modèle pour le DS 2; N<sub>DS2</sub> : Nombre d'observations du DS2**

**Équation 9 : Formule de la RMSEE et de la RMSEP**

Pour déterminer les espèces moléculaires d'intérêt, deux critères sont examinés. Le premier est le tracé des coefficients centrés réduits de la PLS-R. Il permet d'apprécier la significativité des coefficients et de retirer du modèle les variables les moins contributives aux variations de Y. Conformément aux recommandations de Wold<sup>246</sup>, chaque variable est retirée prudemment en observant les conséquences sur l'ajustement et la prédiction du nouveau modèle. Le modèle final est un compromis entre la qualité de l'ajustement et de la prédiction, il vise aussi à minimiser le nombre de variables latentes. Le second critère est l'observation du tracé des VIP ou « Variable influence on the projection ». Ces valeurs permettent de résumer la contribution de chaque variable X au modèle

PLS. La moyenne des VIP est égale à 1. Lorsqu'une variable présente une valeur de VIP supérieure à 1, on peut considérer qu'elle a une influence sur les Y supérieure à la moyenne<sup>328,329</sup>.

Au préalable, une OSC-PLS-DA a été effectuée avec le DS2 pour sélectionner les variables discriminantes. Comme précédemment décrit, le DS2 est prétraité par le logiciel Mzmine 2.25. La matrice résultante comporte 1826 variables et 29 échantillons. L'acquisition du set de prédiction a été différée dans le temps par rapport au DS1. Pour corriger les différences d'intensité observées, une correction du signal a été effectuée au moyen de l'algorithme PQN ou Probabilistic Quotient Normalization en utilisant comme référence le DS1<sup>330</sup>. Le principe comprend 4 étapes. Il s'agit de calculer le spectre de référence à partir de la médiane de chaque variable des échantillons du DS1. Dans un deuxième temps, le rapport entre les intensités des variables du DS2 (échantillons à corriger) et celles du spectre médian est évalué. Les facteurs de correction sont obtenus en calculant la médiane de ces rapports d'intensité. Enfin, les intensités des variables du DS2 sont corrigées en divisant les intensités brutes par les facteurs de correction précédemment obtenus.

### 3 Résultats

#### 3.1 Analyses GC-MS de la composition des phospholipides membranaires

L'analyse des AG méthylés, obtenus après hydrolyse des PL natifs lors de la *trans*-estérification révèle une augmentation importante de la somme des AG polyinsaturés (AGPI) dans les macrophages incubés en présence d'EPA. Cela se manifeste notamment par une augmentation des proportions d'EPA (C20:5) au sein des PL et une augmentation du produit d'élongation de l'EPA (C22:5 ou acide docosapentaénoïque ou DPA), Tableau 22. Ceci s'accompagne d'une diminution de l'acide arachidonique (AA, C20:4) qui est l'AGPI le plus abondant au sein des PL des cellules-témoins, du C20:3 (acide dihomo- $\gamma$ -linoléique ou DGLA) et du C18:2 (acide linoléique ou LA).

En parallèle de l'augmentation des proportions d'AGPI, est observée une diminution de la proportion des AG monoinsaturés (AGMI) concernant principalement le C18:1 (acide oléique, AO) qui est l'AGMI largement majoritaire au sein des PL des macrophages humains. Les proportions des AG saturés (AGS) sont comparables au sein des deux groupes.

Acides gras	T	EPA
C14:0	1,50 ± 0,02	1,53 ± 0,17
C16:0	23,97 ± 0,42	27,46 ± 1,72
C17:0	1,39 ± 0,19	1,41 ± 0,21
C18:0	19,26 ± 0,13	20,93 ± 1,01
C24:0	1,37 ± 1,08	1,42 ± 0,34
$\Sigma$ AGS	46,24 ± 2,55	46,52 ± 4,02
C14:1	0,71 ± 0,43	1,20 ± 0,93
C15:1	1,95 ± 0,35	1,96 ± 0,36
C16:1	2,57 ± 0,17	2,05 ± 0,27
C17:1	1,18 ± 0,15	1,22 ± 0,38
C18:1	17,16 ± 0,22	10,59 ± 1,02
C20:1	0,73 ± 0,39	1,74 ± 0,87
C24:1	2,05 ± 1,48	1,50 ± 0,68
$\Sigma$ AGMI	22,24 ± 1,63	13,07 ± 4,41
C18:2	2,26 ± 0,20	1,50 ± 0,13
C20:3	4,31 ± 0,43	2,02 ± 0,12
C20:4	11,91 ± 0,52	5,95 ± 0,96
C20:5	1,84 ± 0,18	15,40 ± 1,53
C22:4	1,23 ± 0,39	1,24 ± 0,22
C22:5	1,74 ± 0,43	6,92 ± 0,81
C22:6	3,68 ± 1,80	2,13 ± 0,37
$\Sigma$ AGPI	20,3 ± 2,08	27,74 ± 2,82
$\Sigma$ (AGMI+AGPI)/AGS	0,99 ± 0,08	0,98 ± 0,12
UI	103,62 ± 8,83	134,41 ± 14,85
Autres	2,56	2,92

Chaque acide gras est exprimé en pourcentage du total des acides gras observés et identifiés. Les données sont décrites grâce à la moyenne des analyses  $\pm$  SEM (n=20). Les acides gras de moins de 1 % ne sont pas mentionnés mais ont été utilisés pour le calcul des paramètres suivants : AGS: AG saturés, AGMI: AG monoinsaturés, AGPI: AG polyinsaturés, UI : index d'insaturation =  $\Sigma$ (% Acides gras insaturés x nombre d'insaturations)

Tableau 22 : Proportion des différents acides gras des PL membranes des HMDM témoins (T) et HMDM-EPA (EPA)

### 3.2 Analyse des données LC-MS-détecteur à aérosol chargé (CAD)

Des travaux antérieurs de notre équipe ont démontré que l'addition d'EPA (70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) aux milieux de cultures des macrophages (HMDM et lignée de macrophages de Souris J774), était responsable d'une diminution de l'efflux du cholestérol ABCA1-dépendant associée à une modification de la répartition des différents AG membranaires. Toutefois, la seule analyse des AG méthylés en GC-MS ne permettait pas d'analyser une éventuelle modification des classes de PL ou de leurs espèces moléculaires<sup>282</sup>.

Afin d'explorer ces modifications, nous avons choisi d'utiliser une technique NP-LC couplée à un CAD et à un spectromètre de masse ultra-haute résolution. Cette méthode permet ainsi la séparation de 10 classes de PL, Figure 64.

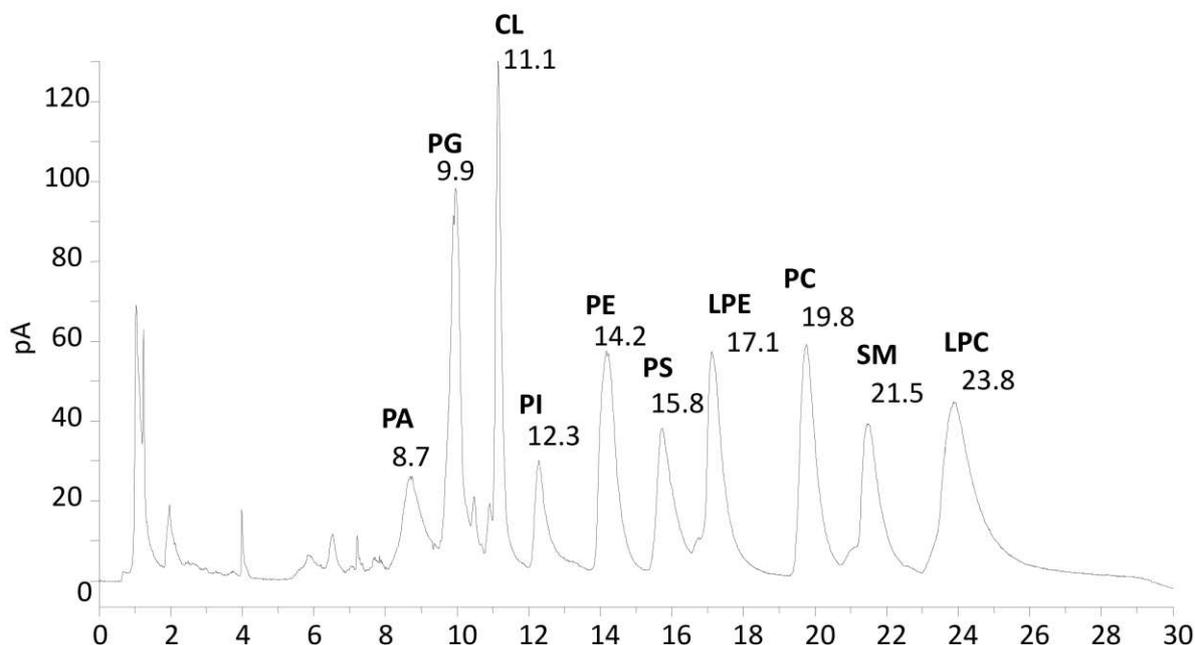


Figure 64 : Profil chromatographique obtenu à partir d'un mélange de phospholipides en utilisant une détection Corona

Le détecteur Corona permet de montrer qu'il n'existe pas de différences significatives entre les 5 différentes classes de PL qui ont été quantifiées (Figure 64). Comme attendu les PC sont les PL majoritaires (47 %) suivies des PE représentant 22 % puis des PS et PI qui représentent respectivement 7,5 % et 5,6 % des PL totaux. Les SM représentent, quant à elles, un peu moins de 18,9 % des PL détectés.

Les LPE et LPC ne sont pas reportés dans les données de la Figure 65, bien qu'il existe un pic chromatographique, ce point a déjà été abordé dans le chapitre 4. En effet, l'observation des données de spectrométrie de masse pour le LPC montre que ce pic correspond à des impuretés et non à des espèces lipidiques. De la même façon, le pic chromatographique correspondant au temps de rétention des LPE montre des  $m/z$  compris entre 1140 et 1280. L'identification de ces composés grâce aux données de fragmentation montre que ces espèces moléculaires correspondent à des gangliosides 3 (GM3). Ces espèces n'ont pas été ajoutées dans le mélange de standards de PL ce qui ne permet pas de réaliser leur quantification. A noter que les CL, PA et PG ne sont pas mis en évidence en utilisant les profils chromatographiques avec le CAD.

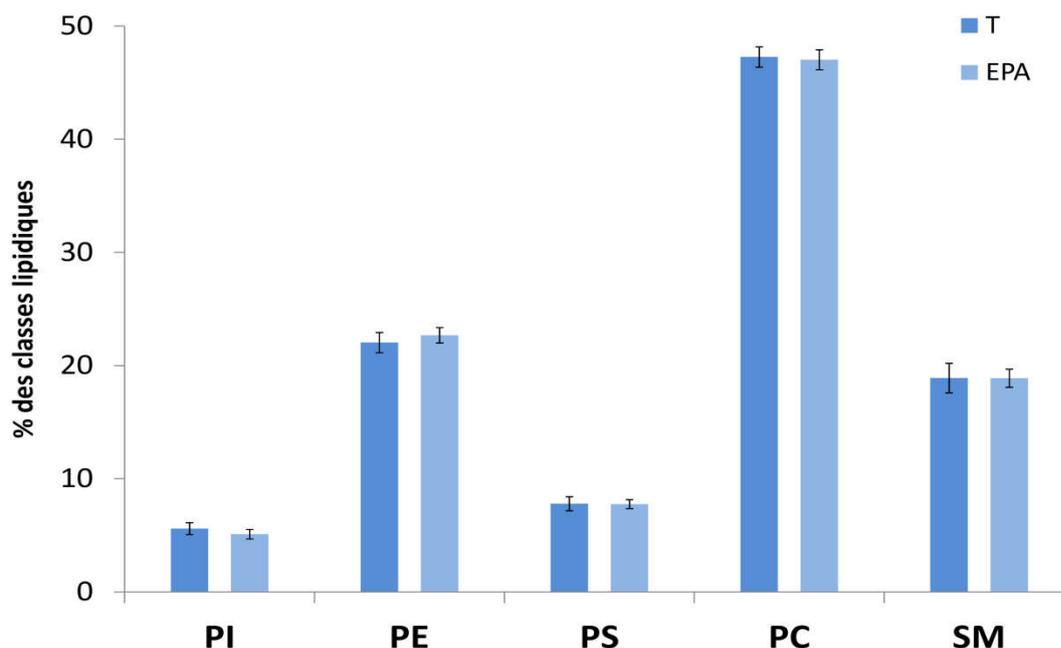


Figure 65 : Composition relative des différentes classes de phospholipides obtenus par NP-LC Corona entre les cellules témoins (T) et les cellules supplémentées par 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  d'EPA (EPA)

Nous avons ensuite procédé à une analyse fine de la composition des espèces moléculaires des différentes classes de PL par NP-LC-LTQ-Orbitrap™ puis à l'analyse chimiométrique des données obtenues afin de détecter des différences potentielles entre les deux groupes de cellules.

Le tracé des scores des échantillons après ACP montre que la variance expliquée ( $R^2X$ ) est respectivement de 0,459 et 0,131 pour les deux premières composantes principales. La capacité de prédiction est de 0,469 ( $Q^2$  cumulés) (Figure 66). On observe que la deuxième composante permet de séparer les deux groupes tandis que la première composante exprime les différences d'intensité observées au sein des échantillons. L'analyse non supervisée des profils LC-MS montre qu'il existe des différences de composition des PL au sein de ces groupes. Pour déterminer quelles variables sont responsables de cette organisation nous avons alors utilisé des modèles d'analyses discriminantes.

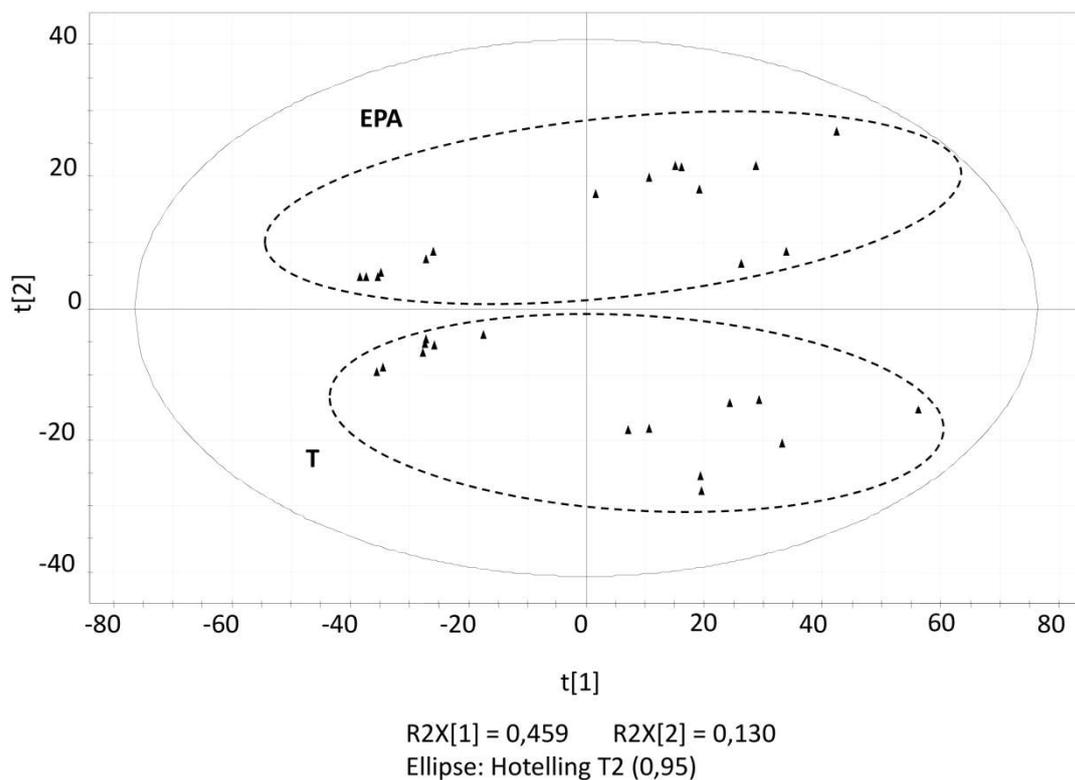


Figure 66 : Tracé des scores après une analyse en composante principale (ACP) des profils LC-MS obtenus du DS1

### 3.3 Les analyses discriminantes

#### 3.3.1 Analyses chimiométriques

La Figure 67 (A) montre le tracé des scores obtenus après PLS-DA des profils LC-MS des échantillons du DS1 suivant les deux premières variables latentes. La variance expliquée ( $R^2Y$ ) est respectivement de 0,834 et 0,027 pour les deux premières composantes. La capacité de prédiction ( $Q^2$  cumulé) est de 0,732. La première composante peut être considérée comme discriminante.

La Figure 67 (B) représente le tracé des scores suivant les deux premières composantes après OSC-PLS-DA. La première composante présente une bonne modélisation de classe ( $R^2Y = 0,829$ ) ainsi qu'une bonne capacité de prédiction ( $Q^2 = 0,821$ ) avec  $R^2X = 0,422$ . Elle rassemble la totalité de l'information discriminante malgré une dispersion intra-classe importante.

A partir de ce modèle, le diagramme de variance-covariance est tracé pour connaître quelles variables peuvent être considérées comme discriminantes. Elles sont sélectionnées à partir d'un niveau

de corrélation supérieur à 0,7 et d'une covariance supérieure à 0,1. Cette zone est indiquée par les carrés rouges dans la Figure 67 (C). L'identification des PL est réalisée à partir des données de spectrométrie de masse en tandem (MS2, MS3) réalisées dans la trappe ionique à basse résolution. Les métabolites sont identifiés en comparant les spectres expérimentaux aux spectres de référence disponibles sur le site [www.lipidmaps.com](http://www.lipidmaps.com).

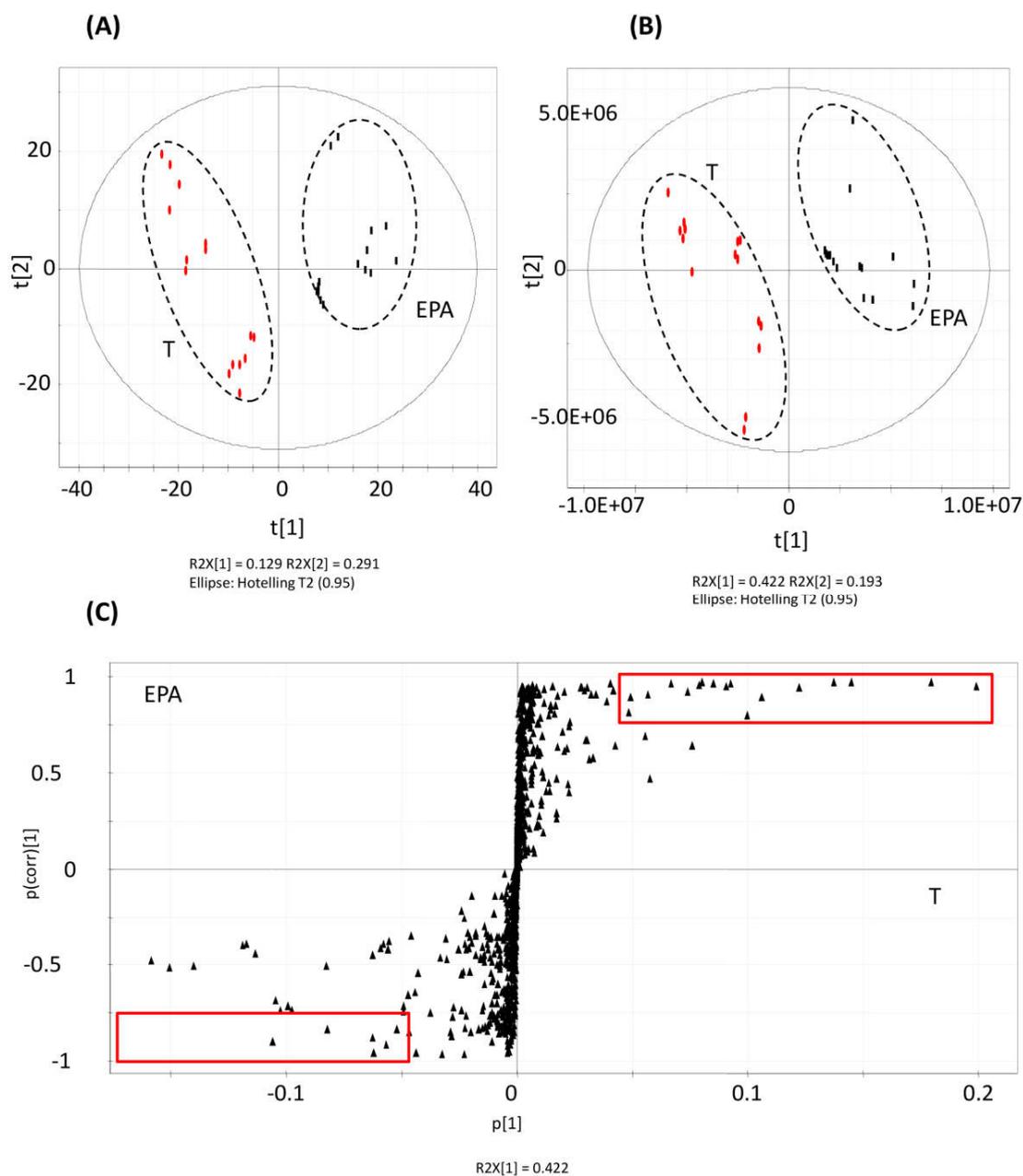


Figure 67 : Tracé des scores des échantillons de macrophages témoins et des macrophages-EPA après PLS-DA (A), OSC-PLS-DA (B) et S-plot correspondant (C)

### 3.3.2 Espèces moléculaires identifiées comme discriminantes

Le Tableau 23 présente l'ensemble des 28 espèces identifiées comme discriminantes. Elles se répartissent de la façon suivante : 19 variables sont surexprimées dans le groupe EPA et 9 espèces sont surexprimées chez les macrophages témoins. Parmi les 19 variables on observe 9 PC dont 2 plasmalogènes, 4 PE équitablement réparties entre diacyl-PE et plasmalogènes, 4 PI et 2 PS. Pour le groupe T, les espèces surexprimées correspondent à 4 PE qui sont exclusivement des éthers-PE, 3 PC (dont 2 éthers-PC) et 2 PI.

Adduits observés	m/z ; identification	Corrélation (%)	Covariance (%)
<b>Surexprimés chez EPA</b>			
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	864,60 ; PC (18:1/20:5)	97,4	8,0
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	822,58 ; PC (P-16:0/20:5)	97,2	3,9
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	866,59 ; PC (18:0/20:5) PC (16:0/22:5)	97,0	19,9
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	838,56 ; PC (16:0/20:5)	96,9	14,5
[M-H]-	764,52 ; PE (18:0/20:5) PE (16:0/22:5)	96,8	13,7
[M-H]-	792,55 ; PE (18:0/22:5)	96,2	8,5
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	894,60 ; PC (18:0/22:5)	95,7	7,9
[M-H]-	720,50 ; PE (P-16:0/20:5)	95,2	19,9
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	940,60 ; PC (22:5/22:5)	94,4	2,7
[M-H]-	883,53 ; PI (18:0/20:5)	94,3	12,2
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	912,59 ; PC (20:4/22:6)	94,1	2,8
[M-H]-	881,52 ; PI (18:1/20:5)	94,0	3,0
[M-H]-	855,51 ; PI (16:0/20:5)	93	2,9
[M-H]-	808,51 ; PS (18:0/20:5) PS (16:0/22:5)	92,9	4,1
[M-H]-	748,53 ; PE (P-16:0/22:5) PE (P-18:0/20:5)	92,4	7,4
[M-H]-	911,56 ; PI (18:0/22:5)	90,3	3,2
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	850,59 ; PC (P-18:0/20:5)	89,7	1,7
[M-H]-	836,54 ; PS (18:0/22:5)	89,5	10,6
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	892,60 ; PC (18:1/22:5)	89,3	4,9
<b>Surexprimés chez les Témoins</b>			
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	826,57 ; PC (O-16:0/20:4)	95,8	4,4
[M-H]-	750,54 ; PE (P-18:0/20:4) PE (P-16:0/22:4)	95,5	6,2
[M-H]-	722,51 ; PE (P-16:0/20:4)	89,6	10,6
[M-H]-	887,56 ; PI (18:0/20:3)	87,6	6,3
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	870,58 ; PC (18:0/20:3) PC (18:1/20:2)	85,1	2,8
[M-H]-	752,54 ; PE (O-18:0/20:4) PE (P-18:0/20:3) PE (O-16:0/22:4)	84,6	1,9
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	846,62 ; PC (18:0/18:1) PC (16:0/20:1)	83,6	5,2
[M-H]-	885,54 ; PI (18:0/20:4)	83,2	8,2
[M-H]-	724,52 ; PE (O-16:0/20:4) PE (P-16:0/20:3)	82,5	2,2

**Tableau 23 : Coordonnées des variables identifiées dans le modèle cellules témoins versus EPA considérées comme discriminantes**

### 3.3.2.1 Phospholipides discriminants dans le groupe EPA

Les corrélations des variables s'échelonnent de 89,3 % à 97 % avec de fortes covariances. La variable qui est à l'extrémité du S-plot est  $m/z$  720,50 et correspond au plasmalogène de PE, PE (P-16:0/20:5) avec une corrélation de 95,2% et presque 20% de covariance.

Concernant les diacyl-PL, une majorité d'espèces discriminantes présente des AG en position *sn1* à base de C16:0 (acide palmitique), C16:1 (acide palmitoléique), C18:0 (acide stéarique) et C18:1 (acide oléique). Les AG en position *sn2* des diacyl-PL sont majoritairement caractérisés par la présence d'un AG sous forme d'EPA ou de DPA. C'est le cas notamment pour les PC sous forme d'ions  $m/z$  838,56 ; 864,60 ; 866,58 ; 892,60 et 894,60 ; pour les PE sous forme d'ions  $m/z$  764,52 ; 792,55 ; pour les PI sous forme d'ions  $m/z$  855,51 ; 883,53 et 911,56 et pour les PS  $m/z$  808,51 et 836,54. Par ailleurs, on observe la présence de deux ions présentant en position *sn1* et *sn2* des AGPI :  $m/z$  912,59 ; PC (20:4/22:6) et  $m/z$  940,60 ; PC (22:5/22:5). Comme le montre la Figure 68 (D) ces espèces sont minoritaires par rapport aux autres ions cités précédemment.

Enfin, 4 ions correspondent à des plasmalogènes de PE et de PC. Ces espèces présentent qualitativement les mêmes AG pour les PC  $m/z$  822,58 ; PC (P-16:0/20:5) et  $m/z$  850,59 ; PC (P-18:0/20:5) et pour les PE :  $m/z$  720,50 ; PE (P-16:0/20:5) et  $m/z$  748,53 PE (P-16:0/22:5) PE (P-18:0/20:5).

### 3.3.2.2 Phospholipides discriminants dans le groupe Témoin

Les variables discriminantes identifiées dans le groupe T présentent un niveau global de corrélation plus faible que dans le groupe EPA. En effet, seulement deux variables ont un niveau de corrélation supérieur à 90 %. La variable à l'extrémité du S-plot du côté des macrophages témoins, est  $m/z$  722,51 qui est le plasmalogène de PE (P-16:0/20:4) qui présente une homologie de structure avec l'ion  $m/z$  720,50 ; PE (P-16:0/20:5) surexprimé dans le groupe EPA. Parmi les autres éthers de PE discriminants, on observe l'ion  $m/z$  724,52 ; PE (O-16:0/20:4) PE (P-16:0/20:3) et l'ion  $m/z$  750,54 PE (P-18:0/20:4) et PE (P-16:0/22:4) ainsi que l'ion  $m/z$  752,54 ; PE (O-18:0/20:4) PE (P-18:0/20:3) PE (O-16:0/22:4).

Les autres classes de PL sont des PC et PI présentant des AGPI en position *sn2*. Ce sont principalement des AG comme le DGLA :  $m/z$  870,58 ; PC (18:0/20:3) et  $m/z$  887,56 PI (18:0/20:3) ou de l'AA comme  $m/z$  826,57 ; PC (O-16:0/20:4) et  $m/z$  885,54 ; PI (18:0/20:4).

Les espèces discriminantes constitutives du groupe T présentent une majorité d'espèces moléculaires correspondant à des éthers de PE ayant en position *sn2* des AGPI. Les intensités moyennes et les SEM des variables discriminantes sont représentées dans la Figure 68 pour les groupes T et EPA. Ainsi, on constate que l'EPA est incorporé parmi les classes PI, PE, PS et PC. Il se retrouve parmi ces PL en position *sn2* soit sous forme native (EPA) ou sous forme de son produit d'élongation (DPA). Ce remodelage des acides gras en position *sn2* se fait au détriment des espèces moléculaires présentant de l'AA ou DGLA en position *sn2*.

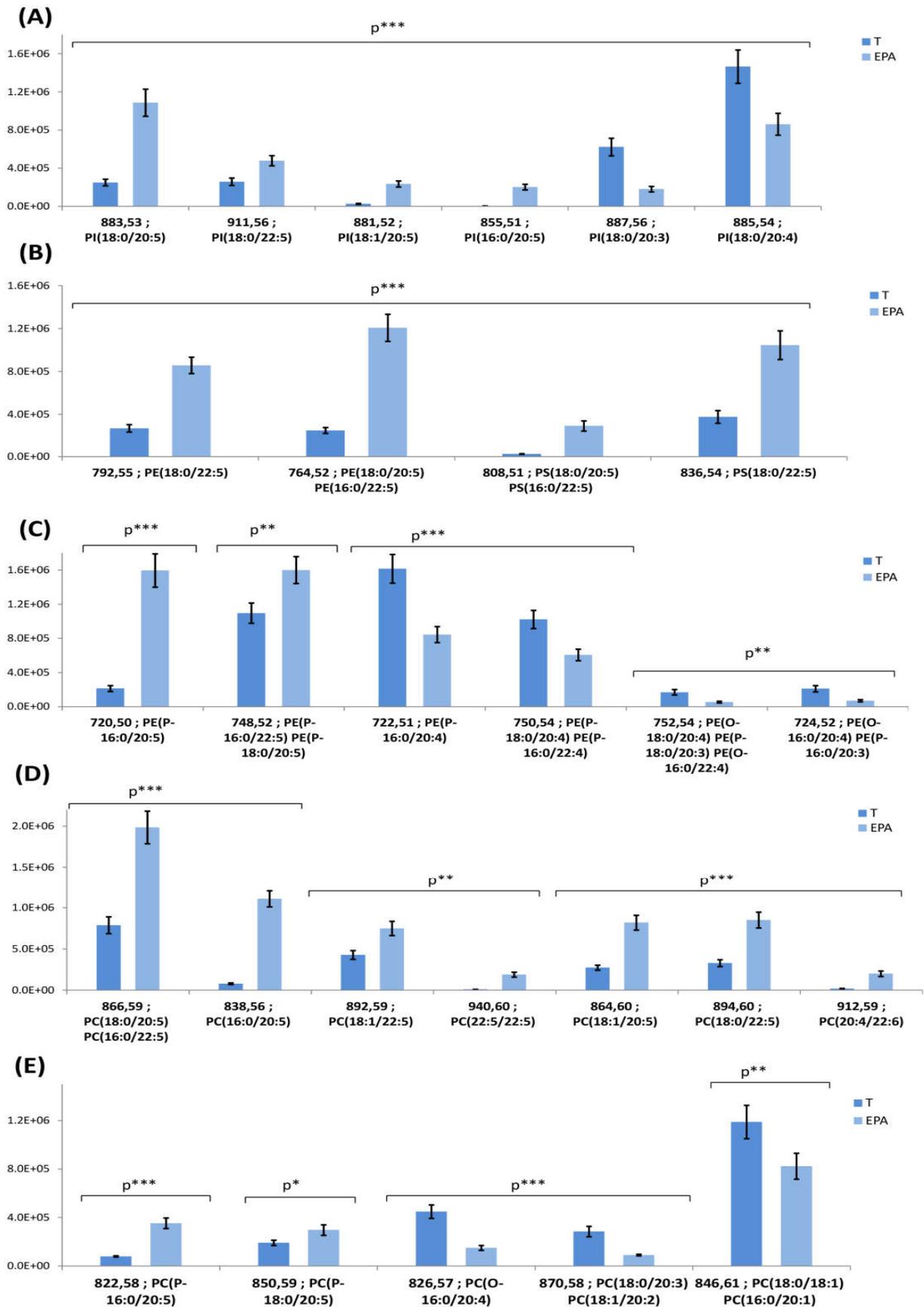


Figure 68 : Niveau moyen des intensités des ions observées en spectrométrie de masse pour les PI (A), diacyl-PE et PS (B), les éthers-PE (C) et les PC (D et E) considérées comme discriminantes

### 3.3.3 Modélisation et prédiction de l'efflux du cholestérol en fonction du pourcentage de surexpression des variables discriminantes

#### 3.3.3.1 Analyse des données d'efflux du cholestérol

Neuf mesures d'efflux du cholestérol ont été réalisées, l'ensemble des données concernant ces mesures sont présentées dans le Tableau 24.

		Efflux T	Efflux EPA	Impact de l'EPA sur l'efflux du cholestérol (% de diminution)
DS1	Donneur 1	6,30 ± 0,31	5,92 ± 0,25	6,17
	Donneur 3	6,37 ± 0,56	3,54 ± 0,33	44,54
	Donneur 4	5,97 ± 0,12	4,62 ± 0,14	22,66
	Donneur 6	4,15 ± 0,21	2,75 ± 0,08	33,86
	Donneur 7	2,31 ± 0,26	2,16 ± 0,13	6,56
DS2	Donneur 8	9,25 ± 1,50	4,57 ± 0,08	50,57
	Donneur 9	6,24 ± 0,15	5,05 ± 0,03	19,15
	Donneur 10	10,46 ± 0,42	8,80 ± 0,93	15,93
	Donneur 11	5,13 ± 0,41	3,60 ± 0,17	29,88
Diminution de l'efflux de cholestérol (n=9)				25,48

**Tableau 24 : Efflux radioisotopique du cholestérol (4h) en présence de 15 µg/mL d'ApoA1 mesuré au cours des différentes expériences chez les cellules T et cellules EPA**

La diminution des capacités d'efflux du cholestérol en présence d'EPA est variable. Elle peut être modérée autour de 6 % (donneurs 1 et 7), en moyenne comprise autour de 20 à 40 % (donneurs 3, 4, 6, 9, 10 et 11) et parfois atteindre 50 % de diminution comme observé pour le donneur 8.

En moyenne (n = 9) l'efflux du cholestérol est diminué de 25,5 % en présence d'EPA 70 µmol.L<sup>-1</sup>. Cette valeur est proche de celle retrouvée lors des études antérieures (28 %) <sup>282</sup>. Cette valeur moyenne est soumise à des variations. La suite de cette étude a pour objet de relier les variations d'efflux du cholestérol aux variations d'intensité des espèces moléculaires discriminantes.

### 3.3.3.2 Régression PLS (PLS-R) des pourcentages de variation des variables discriminantes en fonction de la diminution d'efflux du cholestérol

#### 1/ Modèle de régression

Le modèle 1 (M1) est constitué de l'ensemble des variables discriminantes comme paramètres ( $k = 28$ ). Il permet de confirmer qu'il existe des tendances entre les différences d'expression des variables discriminantes et la diminution d'efflux.

Le modèle 2 (M2) est obtenu en éliminant les variables qui présentent des coefficients centrés réduits non significatifs. L'élimination de ces variables permet de réduire le modèle à une composante et améliore les différents paramètres de validation (RMSEE,  $R^2(Y)$  et  $Q^2$  cumulés)<sup>246</sup>. Le Tableau 25 présente les différents paramètres de la PLS-R de M1 et M2.

Modèle 1	Nombre de composantes					3
	Nombre de paramètres					28
	Composante					1 2 3
	R <sup>2</sup> (Y) cumulé					0,947 0,980 0,999
	Q <sup>2</sup> (cumulé)					0,292 0,430 0,740
	RMSEE					4,650E-02
	Y var	0,062	0,445	0,227	0,339	0,066
	Y pred	0,059	0,445	0,225	0,339	0,069
	Somme des carrés des écarts					2,168E-05
Modèle 2	Nombre de composantes					1
	Nombre de paramètres					6
	Composante					1
	R <sup>2</sup> (Y) cumulé					0,903
	Q <sup>2</sup> (cumulé)					0,787
	RMSEE					6,028E-02
	Y var	0,062	0,445	0,227	0,339	0,066
	Y pred	7,514E-03	0,429	0,240	0,314	1,487E-01
	Somme des carrés des écarts					1,090E-02

Tableau 25 : Caractéristiques des paramètres de validation des modèles M1 et M2

Pour les deux modèles, le tracé des Y prédits en fonction des Y observés montre un bon ajustement ( $R^2 > 0,900$ ), Figure 69. Cependant, M2 modélise moins bien les valeurs d'efflux qui sont inférieures à 10 %. A partir de (M2), les variables d'importance sont recherchées en sélectionnant les coefficients de la PLS-R significatifs et dont les valeurs de VIP ou variables d'influence sur la projection sont supérieures à 1.

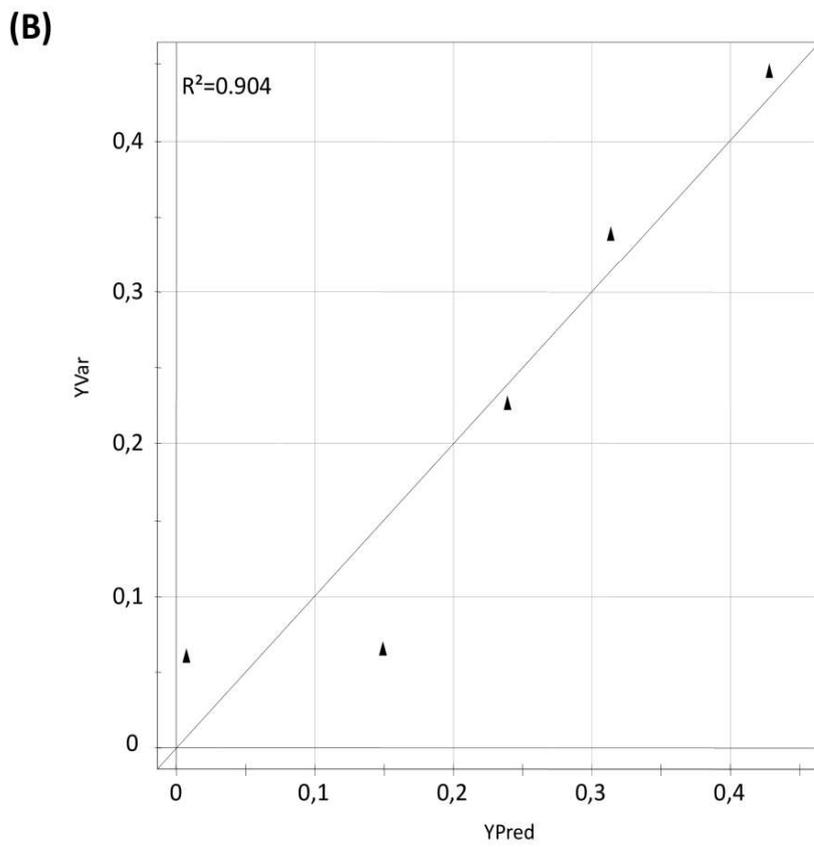
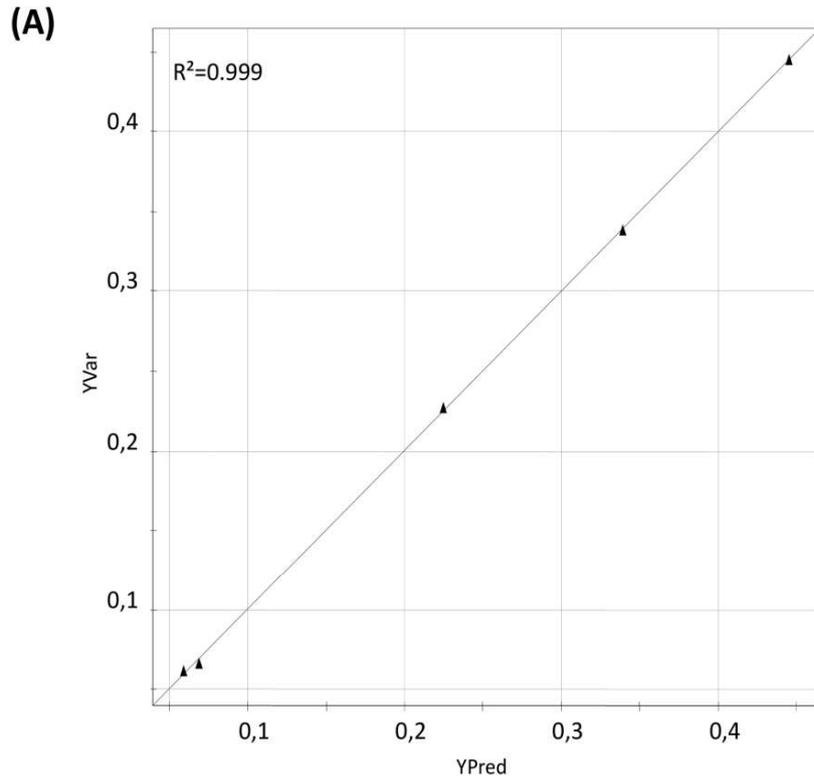


Figure 69 : Tracé des Y prédits en fonction des Y expérimentaux pour M1 (A) et M2 (B)

## 2/ Variables d'intérêt

Les variables d'intérêt sont sélectionnées à partir du tracé des coefficients centrés réduits de la PLS-R (Figure 70 (A)). Le seuil de significativité des coefficients est exprimé pour une *p-value* de 0,05. Le second critère est le tracé des VIP (Figure 70 (B)). Il permet de choisir les variables qui présentent une valeur de VIP significative et supérieure à 1 : deux variables discriminantes répondent à ces critères (Figure 70 (C)). Lorsque les rapports des intensités entre EPA et T augmentent pour la variable *m/z* 911,56 ; PI (18:0/22:5), l'impact de l'EPA sur l'efflux du cholestérol est plus important. Au contraire, l'augmentation du rapport des intensités entre EPA et T pour la variable *m/z* 808,51 ; PS (18:0/20:5) PS (16:0/22:5) réduit l'effet de l'EPA sur l'efflux du cholestérol.

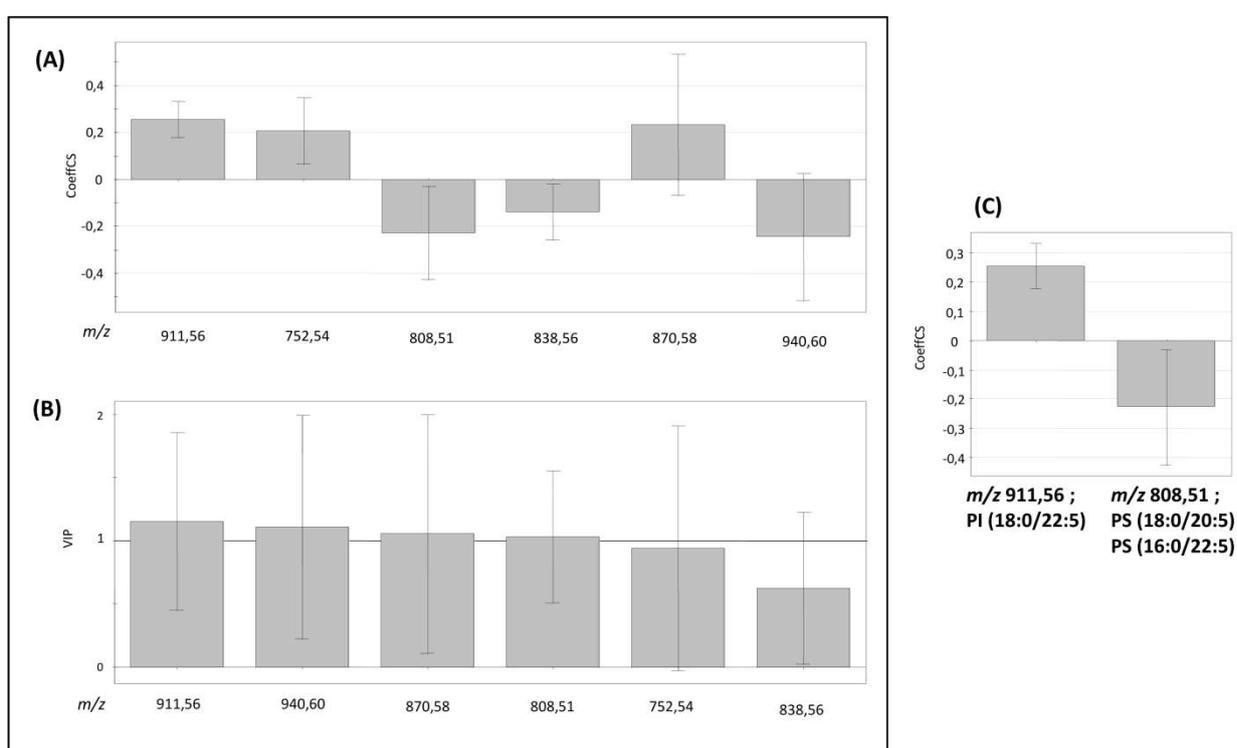
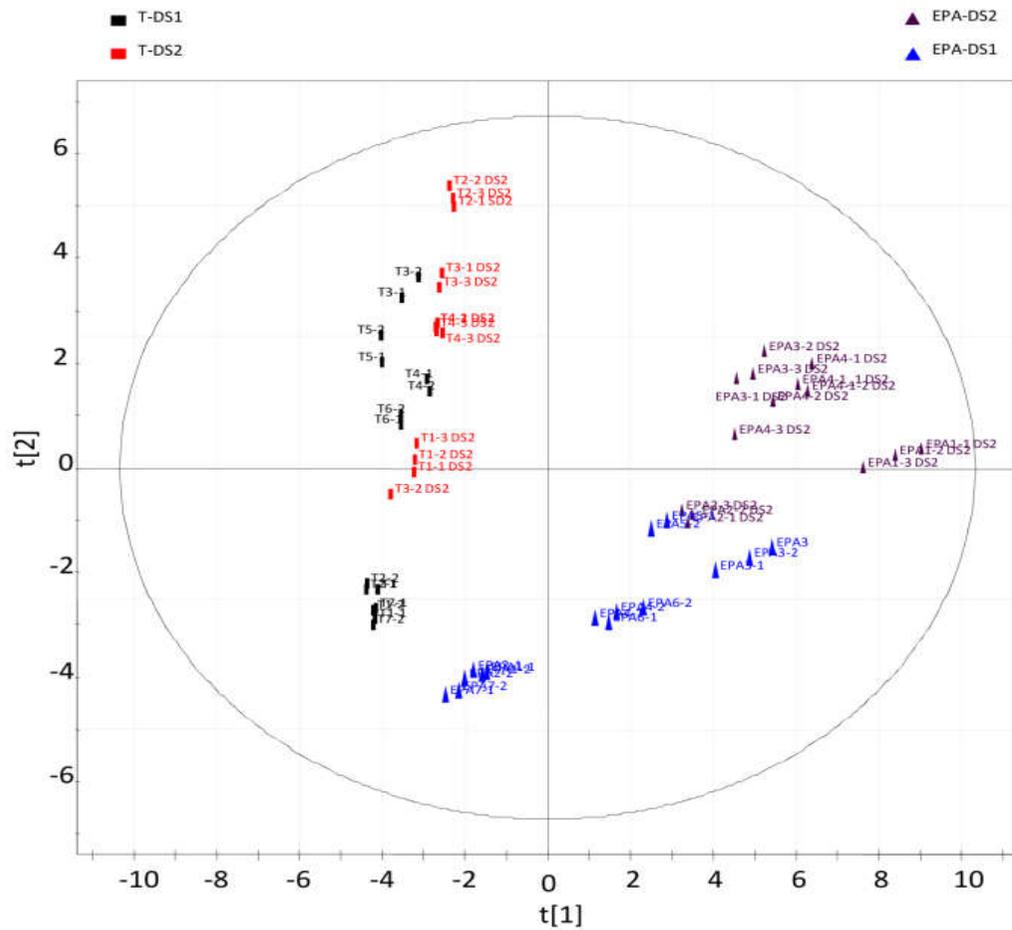


Figure 70 : (A) Coefficients centrés réduits des différentes variables du Modèle 2 (B) VIP des variables du Modèle PLS 2, (C) Coefficients centrés réduits des variables ayant des VIP supérieures à 1 et des coefficients significatifs

## 3/ Prédiction de l'efflux du cholestérol par le modèle PLS-R

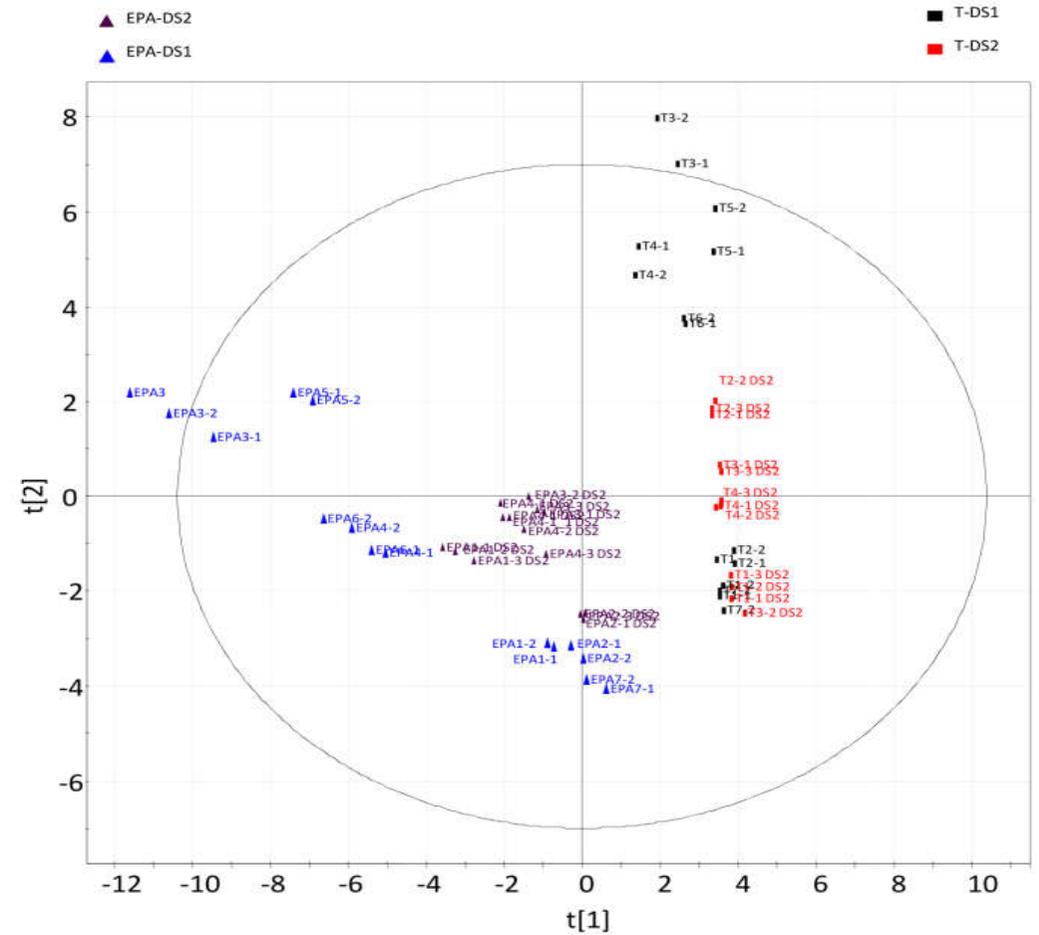
La prédiction s'effectue à partir des données du DS2. Pour comparer les différents échantillons, une correction des intensités brutes des variables discriminantes a été réalisée en utilisant les données du DS1 comme set de référence à partir de la méthode PQN. Une ACP a été réalisée pour observer les différences entre les deux sets avant et après correction. Les tracés des scores sont représentés dans la Figure 71.

(A)



R2X[1] = 0.592 R2X[2] = 0.249  
Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

(B)



R2X[1] = 0.598 R2X[2] = 0.271  
Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

Figure 71 : (A) Tracé des scores du DS1 et DS2 avant correction et (B) tracé des scores du DS1 et DS2 après correction

La Figure 71 (A) montre qu'il est possible de tracer graphiquement une frontière qui sépare les échantillons appartenant au même groupe (T ou EPA) mais issus de sets différents. Cette tendance est particulièrement marquée pour les échantillons EPA. Après correction PQN des intensités du DS2, les tendances observées précédemment sont plus discrètes. En effet, il semble que chaque groupe d'échantillons fait partie d'un seul set de données. Le calcul des pourcentages de diminution est alors effectué à partir de ces intensités corrigées.

Les efflux prédits présentent des écarts compris entre 4 et 8 % (Tableau 26). Ils sont de l'ordre de grandeur de l'intervalle de confiance de l'effet de l'EPA sur l'efflux qui est de 5 % ( $24,9 \pm 5,1$ ). La RMSEP est égale à  $6,24E-02$ . Cette valeur est du même ordre de grandeur que la RMSEE calculée pour le set d'apprentissage. Lorsque pour un même modèle la RMSEE et la RMSEP sont comparables le modèle construit n'est pas en surapprentissage (Figure 72).

Donneur	Y prédit (%)	Y observé (%)	Valeurs absolues des écarts (%)
8	46,60	50,57	3,97
9	11,58	19,15	7,57
10	10,57	15,93	5,36
11	22,51	29,88	7,37

Tableau 26 : Ecarts observés entre les valeurs prédites et les valeurs observées expérimentalement de l'efflux du cholestérol

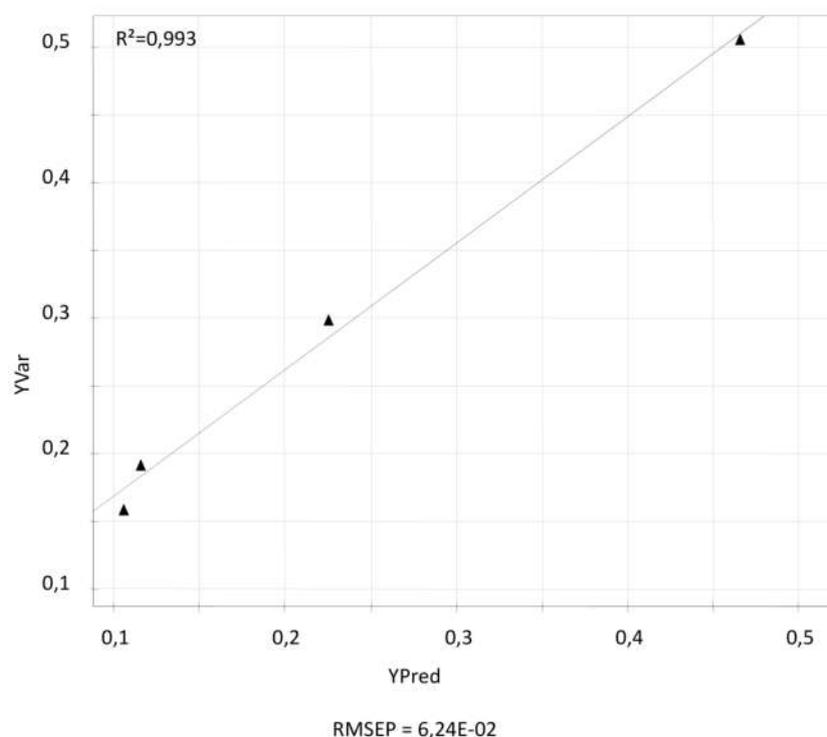


Figure 72 : Tracé des Y observés en fonction des Y prédits pour le DS2

## 4 Discussion

Ce travail a pour origine l'une des thématiques de l'équipe 1 (Athérosclérose : homéostasie et trafic du cholestérol des macrophages) de Lip(Sys)<sup>2</sup> portant sur l'étude de l'impact de la composition en AG des PL membranaires sur l'efflux du cholestérol cellulaire. Cette thématique repose sur l'émission de l'hypothèse selon laquelle une modification de cette composition influence l'activité des transporteurs du cholestérol en modifiant les propriétés physicochimiques des PL affectant ainsi l'organisation des membranes et/ou en modifiant leurs rôles fonctionnels comme sources d'AG servant de seconds messagers dans les voies de signalisation lipidique. Ce type d'étude de recherche fondamentale trouve sa justification dans le contexte des maladies cardio-vasculaires où la composition en AG circulants varie pour des raisons nutritionnelles (par exemple déséquilibre entre les apports en AGPI n-6 et n-3, ou encore apport excessif en AG saturés) ou des raisons physiopathologiques, une anomalie typique rencontrée chez des patients à risque cardio-vasculaire élevé tels que les sujets hypertriglycéridémiques, les patients obèses ou les diabétiques de type 2, étant une augmentation des concentrations circulantes des AG libres. Par ailleurs, en dehors même de tout contexte pathologique, la période postprandiale s'accompagne aussi d'un afflux d'AG dans l'environnement des monocytes-macrophages, AG libérés lors de l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides.

Ainsi, que ce soit dans un contexte physiologique et nutritionnel ou dans un contexte physiopathologique, on conçoit qu'une variation chronique de la nature et des concentrations des AG circulants puisse avoir une répercussion sur la composition en AG des membranes des cellules. Des modèles cellulaires d'étude ont donc été développés pour simuler une **modification chronique** de la membrane des macrophages afin d'étudier les conséquences de l'incorporation membranaire de différents types d'AG sur l'efflux du cholestérol des macrophages.

Une preuve de concept a été apportée lors de travaux antérieurs montrant que l'incorporation d'AG *trans*, notamment l'acide élaïdique, dans les PL membranaires, inhibait l'efflux dépendant de l'ABCA1 d'environ 23%. Cette action inhibitrice n'était pas due à une modification de l'expression de l'ABCA1 ni de son trafic intracellulaire mais était reliée à une diminution de l'activité ATPasique du transporteur, diminution elle-même reliée à celle de la fluidité membranaire indirectement appréciée par le calcul du rapport  $(AGMI+AGPI)/(AGS+AG\ trans)^{275}$ .

L'étude des conséquences de l'incorporation chronique des AGPI dans la membrane cellulaire a ensuite été privilégiée pour au moins trois raisons : 1) l'impact bénéfique potentiel d'une alimentation riche en AGPI n-3 sur la prévention primaire des maladies cardio-vasculaires comme cela a été montré par certaines études chez l'Homme ou l'animal, 2) leur structure particulière suggère que

les modifications physico-chimiques des membranes consécutives à leur incorporation seront différentes de celles observées avec les AG *trans*, 3) les AGPI exercent sur différents types cellulaires de nombreux effets en modulant les propriétés des membranes, la fonctionnalité des protéines membranaires, la production de seconds messagers comme les eicosanoïdes et différentes voies de signalisation.

Le principal résultat obtenu avec des macrophages humains (HMDM) non surchargés en cholestérol a été de montrer que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3, 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) entraînait une diminution dose-dépendante (-28%) de l'efflux du cholestérol dépendant de l'ABCA1. L'addition d'EPA provoquait une modification nette de la composition en AG des PL se traduisant par l'incorporation importante d'EPA et de son produit d'élongation, l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5 n-3) au détriment de l'acide arachidonique (AA) dont la concentration membranaire diminue. Ceci n'entraînait aucune modification de l'expression ni de la localisation du transporteur ABCA1. L'action délétère de l'EPA sur la fonctionnalité de l'ABCA1 passe par une diminution de l'activité ATPasique du transporteur *via* la voie de la PKA<sup>282</sup>.

Le fonctionnement de l'ABCA1 dépend de la composition de la membrane dans laquelle il est inséré comme toutes les protéines présentes dans la bicouche de PL qui peuvent intervenir dans la régulation de son activité (comme, par exemple, l'adénylatecyclase dans la voie de la PKA). De même, il a été décrit que la fixation de l'apoAI à des domaines proches de l'ABCA1 dépendait de la présence de certaines classes de PL ou que la prise en charge du cholestérol libre dépendait aussi de la composition de la membrane.

L'objectif de mon travail était donc de réaliser une analyse très fine des modifications induites par l'incorporation d'EPA dans la membrane des macrophages et de mettre en relation ces modifications avec l'efflux du cholestérol cellulaire afin de permettre d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes moléculaires. Dans le cadre du chapitre 3, nous avons d'abord défini les conditions analytiques et les outils chimométriques les plus adaptés à la problématique biologique. Ces méthodes ont ensuite été appliquées aux HMDM non surchargés incubés en présence (ou non) d'EPA selon la procédure déjà décrite dans la section « matériel et méthodes » de ce chapitre. Au terme de cette incubation, l'efflux du cholestérol est mesuré et les lipides totaux sont extraits et analysés par 3 méthodes complémentaires : *i*) une analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour déterminer la composition en AG, *ii*) la quantification des classes de PL par détection Corona couplée à une NP-LC, *iii*) l'analyse des espèces moléculaires des classes de PL par chromatographie en phase normale couplée au LTQ-Orbitrap. Les données ont été analysées par chimométrie au moyen d'analyses discriminantes.

Il a été décrit que les classes de PL membranaires pouvaient influencer l'activité de l'ABCA1, particulièrement la SM et le rapport PC/SM, l'augmentation de la teneur en SM s'opposant à la sortie du cholestérol libre<sup>331</sup>. Par ailleurs, si l'ABCA1 est un transporteur-clé du cholestérol libre dans les macrophages, il exporte aussi activement des PL, tels que la PC, la PS ou la SM vers les accepteurs extracellulaires. Enfin, il a été montré dans des modèles de membranes reconstituées, que certaines classes de PL étaient capables de stimuler l'activité ATPasique de l'ABCA1<sup>332</sup>. Ces influences mutuelles entre l'ABCA1 et les classes de PL imposaient donc de déterminer si, dans nos conditions, existaient des différences de composition en classes de PL des membranes entre les HMDM témoins et les HMDM EPA.

La quantification des PL a été réalisée grâce à l'utilisation d'une détection Corona couplée à une NP-LC. Ce mode de chromatographie est habituellement utilisé pour effectuer des séparations en fonction de la nature des têtes polaires qui sont présentées à la surface de la silice modifiée. Le gradient d'élution permet la séparation des lipides allant du domaine de polarité des esters de cholestérol jusqu'aux PL. Ceci explique que ce détecteur soit utilisé dans de nombreuses études<sup>89,253,333-336</sup>. Cette méthode permet de quantifier 10 classes phospholipidiques avec pour limite de quantification, 12,5 µg.mL<sup>-1</sup>. Nous avons pu ainsi déterminer que les PL des HMDM témoins se répartissaient en moyenne de la façon suivante : 47 % de PC, 22 % de PE, 7,5% de PS, 5,6 % de PI et 18,9 % de SM. Il est difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature car il n'existe pas, à notre connaissance, de composition établie pour les macrophages humains ou de façon très parcellaire. La répartition des classes de PL est toutefois conforme à celles publiées pour les cellules de Mammifères qui prennent en compte le fait que cette composition varie en fonction du type cellulaire et, au sein d'une même cellule, en fonction de l'organite considéré<sup>18,153,337-345</sup>.

Nous n'avons pu détecter dans nos conditions des PL considérés comme quantitativement minoritaires tels que l'acide phosphatidique (PA), le phosphatidylglycérol (PG) ou la lysophosphatidyléthanolamine (LPE) qui sont souvent considérés comme représentant physiologiquement moins de 1 % des PL totaux. De même, nous ne détectons pas de lysoPC, son absence ayant déjà été décrite dans des macrophages humains mais surchargés en cholestérol par des LDL modifiées enzymatiquement<sup>342</sup>.

Le point le plus important à noter est que la proportion de chaque classe de PL n'est pas différente entre les HMDM témoins et les HMDM-EPA, ce qui nous permet de conclure que l'inhibition de l'efflux du cholestérol dépendant de l'ABCA1 n'est pas attribuable à une altération de la répartition des classes de PL membranaires.

L'étape suivante a consisté à utiliser une méthode de GC-MS pour déterminer la composition relative des AG méthylés des PL membranaires des deux groupes de macrophages. L'analyse en GC-MS permet de décrire les échantillons avec une vingtaine de variables. Il est alors possible d'interpréter directement les modifications observées contrairement aux données LC-MS où l'analyse exploratoire par ACP est indispensable. Cette information est donc plus facilement exploitable et complète ainsi l'ensemble des informations obtenues. Comme pour les classes de PL, il est difficile de discuter de nos résultats obtenus avec nos HMDM car la description du profil des AG des PL des macrophages humains est très rare dans la littérature. Visioli *et al*<sup>324</sup> qui ont comparé la composition en AG des monocytes humains avant et après leur différenciation en macrophages rapportent un profil de base assez similaire à celui que nous obtenons pour nos HMDM témoins avec notamment un contenu relativement élevé en AGPI ( $24,2 \pm 1,99$  versus  $20,3 \pm 2,08$  pour nos cellules). Les quelques rares différences observées (comme pour l'acide linoléique, C18:2 ou l'EPA (C20:5) par exemple) peuvent être dues à l'utilisation de techniques différentes notamment au niveau de la préparation de l'échantillon (chromatographie sur couche mince, SPE) ou à la sensibilité de la méthode GC-MS utilisée. L'avantage majeur de cette technique est que la préparation de l'échantillon a été préalablement validée en utilisant comme technique de contrôle une méthode de chromatographie liquide récemment publiée<sup>288</sup>. Ces résultats ont été présentés dans le chapitre 4. Ainsi, seule la fraction phospholipidique des échantillons biologiques a été analysée en GC-MS et les interférences des autres fractions (lipides neutres et acides gras libres) sont négligeables. De plus, certain AG méthylé, en particulier le DGLA, est quantifié par cette technique.

L'addition d'EPA (34 heures, 70  $\mu$ mol) est responsable de modifications importantes de la composition en AG des PL des cellules et confirme les résultats précédemment obtenus<sup>282</sup>. Les HMDM incorporent fortement l'EPA qui représente un peu plus de 15 % de l'ensemble des AG estérifiant les PL et qui s'accompagne d'une augmentation importante de son produit d'élongation, l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5). Il est important et intéressant de noter que cette incorporation se fait au détriment de l'acide arachidonique (AA, C20:4) dont la teneur diminue de moitié et, à un degré moindre, de l'acide oléique (C18:1).

La NP-LC couplée à un spectromètre de masse hybride comme le LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup> a ensuite été utilisée pour caractériser et comparer les espèces moléculaires des PL des HMDM témoins et des HMDM-EPA. La possibilité de réaliser conjointement la fragmentation MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup> à l'acquisition Full-Scan grâce à la trappe linéaire permet l'identification d'un grand nombre d'espèces phospholipidiques en une seule injection. A l'évidence, une grande quantité d'informations en un minimum d'injections est obtenue grâce à l'utilisation de ce type de spectromètre de masse. Cette caractéristique (acquisition Full-Scan contemporaine de la fragmentation) est fondamentale puisque la quantité de « biomasse » obtenue lors de la préparation de l'échantillon n'aurait pas pu permettre de

réaliser l'ensemble des analyses ou d'identifier l'ensemble des espèces moléculaires décrites en utilisant un analyseur de masse triple quadripolaire comme dans le chapitre 3.

Le nombre d'espèces surexprimées chez les HMDM témoins est assez limité et concerne principalement des éthers-PE (4), 3 PC et 2 diacyl-PI. Ces espèces moléculaires possèdent en position *sn1* l'un des deux AGS majoritaires révélés par l'analyse en GC-MS, l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0). La position *sn2* est majoritairement occupée par l'acide arachidonique (AA, C20:4) et par l'acide dihomo-gamma-linolénique (DGLA, C20:3). Les cellules dites de l'inflammation, dont font partie les macrophages, sont connues pour leur richesse en AA mais la localisation précise de cet AGPI est moins bien connue. La PI est une source importante d'AA dans ces types cellulaires et l'espèce moléculaire 18:0/20:4 a déjà été décrite comme étant l'espèce moléculaire majoritaire contenant de l'AA dans les macrophages humains<sup>346</sup>. Les éthers de PC et de PE sont aussi considérés comme des espèces moléculaires de PL riches en AA dans les polynucléaires neutrophiles ou les monocytes ou macrophages humains. Nos résultats confirment cette donnée avec notamment les plasmalogènes de PE qui pourraient constituer, comme certains le suggèrent, une véritable réserve d'AA<sup>326,346,347</sup>. Le second AGPI qui caractérise en position *sn2* les espèces moléculaires de PL surexprimées dans les HMDM-témoins est le DGLA. Il s'agit d'un AG à 20 atomes de carbone de la série  $\omega 6$  qui est formé *in vivo* à partir de l'acide linoléique (C18:2,  $\omega 6$ ) qui est un AG essentiel. Ce dernier subit l'action d'une delta6-désaturase pour conduire à l'acide gamma linoléique (GLA, C18:3,  $\omega 6$ ) qui est immédiatement transformé en DGLA (C20:3,  $\omega 6$ ) par l'action d'une élongase. Le DGLA peut subir une désaturation pour donner de l'AA mais la delta5-désaturase qui catalyse cette réaction a une activité relativement limitée chez l'Homme ce qui explique que seule une partie du DGLA soit transformée en AA et donc que cet AG existe en quantité non négligeable<sup>348</sup>. Notre analyse en GC-MS a effectivement montré qu'il représentait 4,3 % des AG totaux soit le deuxième AGPI le plus abondant dans les HMDM témoins. Il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux décrivant la localisation précise du DGLA dans les espèces moléculaires de PL au sein des monocytes ou des macrophages. Les espèces moléculaires en contenant et qui sont surexprimées dans nos cellules témoins sont une PI et une PC et deux plasmalogènes de PE. Il est toutefois à noter que, dans un travail portant spécifiquement sur la modulation de la composition des plasmalogènes de PE lors de la différenciation des monocytes humains en macrophages, Wallner *et al.* observent ces deux espèces moléculaires riches en DGLA dans les macrophages humains, l'espèce moléculaire PE (P-16:0/20:3) étant même le plasmalogène le plus abondant (avec la PE-P-16:0/18:1)<sup>349</sup>.

L'addition d'EPA modifie considérablement la composition des espèces moléculaires des PL membranaires et concerne 4 classes de PL : PC, PE, PI et PS dans lesquelles l'EPA est intégré tel quel ou sous la forme de son produit d'élongation direct, l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5). Ce remodelage de la composition en AG aboutit à la surexpression de 19 espèces moléculaires qui sont

majoritairement les diacyl-PC (9 espèces), les diacyl-PI (4 espèces), les diacyl-PE et les éthers-PE (4 espèces moléculaires au total). Nous avons ainsi pu mettre en évidence les espèces moléculaires de PL plus spécifiquement modifiées lors du remodelage important des AG. Il est particulièrement intéressant de noter que les AG concernés, l'AA, le DGLA et l'EPA sont des AGPI à 20 atomes de carbone. Dans les cellules de l'inflammation, dont les macrophages, ces AG occupent une place prépondérante dans le métabolisme cellulaire en tant que précurseurs des eicosanoïdes (du grec « eikosa » signifiant 20) qui sont des médiateurs oxygénés dérivés de ces AGPI à 20 atomes de carbone. Ces eicosanoïdes sont formés grâce à l'action d'enzymes notamment les cyclooxygénases (COX) donnant les prostaglandines (PG) et les lipoxygénases (LOX) aboutissant à la formation des leucotriènes (LT). C'est pour l'AA que ces médiateurs et leurs effets biologiques ont été jusqu'à présent le plus étudiés et, sans détailler ce métabolisme, il est bien établi que l'action des COX et des LOX donnent naissance aux PG de la série 2 et aux LT de la série 4 impliqués dans de nombreuses pathologies liées à l'existence d'un état inflammatoire chronique comme l'athérosclérose et les cancers. La connaissance du métabolisme des eicosanoïdes issus de l'AA est ainsi à l'origine de certaines classes médicamenteuses dont la plus connue est celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens<sup>12,350</sup>. En revanche, l'action de ces mêmes enzymes sur le DGLA et l'EPA permet la synthèse de PG de la série 1 pour le DGLA et de la série 3 pour l'EPA et des LT de la série 5 (EPA) dont les effets métaboliques s'opposent à ceux des médiateurs issus de l'AA<sup>12,348</sup>. C'est la raison pour laquelle certains auteurs recommandent une approche nutritionnelle d'enrichissement de l'alimentation en DGLA notamment dans les cancers, ses eicosanoïdes possédant des propriétés anti-inflammatoires et anti-prolifératives ou d'EPA dans la prévention des maladies cardio-vasculaires<sup>348,351,352</sup>. Comme nous l'avons indiqué, le modèle cellulaire et le mode opératoire que nous avons choisis visent à reproduire des modifications chroniques de la composition des PL membranaires des macrophages humains pouvant exister *in vivo*. La mise en évidence dans nos conditions expérimentales des profonds remodelages touchant les AGPI à 20 atomes de carbone incite à envisager de développer un axe de recherche visant à étudier les conséquences de ce remodelage sur la production des eicosanoïdes issus de ces AG et les relations éventuelles pouvant exister avec la capacité des macrophages humains à céder leur cholestérol. Ces composés montrent une grande diversité structurale. En effet, la classification de LipidMaps montre qu'il existe un peu moins de 1200 eicosanoïdes répartis en 13 classes. L'analyse des eicosanoïdes est un véritable défi analytique pour plusieurs raisons : *i*) ces médiateurs lipidiques sont présents à très faibles concentrations, *ii*) ils ne sont pas stockés mais sont formés transitoirement et ont parfois une stabilité limitée pour certains d'entre eux, *iii*) le même AGPI peut être oxydé à plusieurs endroits conduisant à la formation d'isomères dont chacun peut avoir un rôle spécifique. Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des méthodes analytiques rapides, ultra-sensibles, précises et spécifiques.

Au vu des caractéristiques de ces molécules, le recueil de l'échantillon est une phase critique. En effet, l'utilisation d'agent complexant ou d'antioxydant en amont de la phase d'extraction peut être recommandée. Les principales techniques de préparation de l'échantillon sont les extractions en phase liquide et/ou les méthodes d'extraction en phase solide. Les eicosanoïdes ont un domaine de polarité comparable à celui du méthanol, ce qui en fait un solvant de choix. Le mélange chloroforme/méthanol est principalement utilisé pour réaliser l'extraction des lipides totaux<sup>40,41</sup>. Ainsi, les lipides neutres et les PLs peuvent gêner la détection des eicosanoïdes. Un volume de méthanol approprié pourrait favoriser une extraction sélective (5 à 10 volumes de méthanol pour un volume de chloroforme). D'autres mélanges de solvants sont décrits comme l'éther ; acétone/chloroforme ; hexane/isopropanol ou encore acétate d'éthyl/éthanol<sup>12,350,353</sup>.

Les méthodes de SPE peuvent servir à concentrer et nettoyer l'échantillon. Cependant, il n'existe pas de méthode universelle de préparation de l'échantillon concernant ces composés. Il est nécessaire, en parallèle du développement chromatographique, d'évaluer les propriétés des différentes techniques de préparation de l'échantillon en utilisant un mélange de standards commerciaux. Un détecteur Corona peut éventuellement être utilisé pour effectuer la mise au point de la méthode chromatographique et pour connaître les performances des différentes méthodes de préparation de l'échantillon. Enfin les standards commerciaux et échantillons biologiques doivent être conservés à une température de -80°C.

Par ailleurs, la technique la plus largement utilisée dans cette problématique est la RP-LC-MS équipée d'une source Electrospray<sup>354-356</sup>. Ce type de chromatographie permet de séparer les différentes espèces moléculaires d'une même classe, offrant la possibilité d'utiliser des supports de silice superficiellement poreuse ou sub-2µm dont le couplage avec la spectrométrie de masse est facilité. Différents analyseurs de masse peuvent être utilisés mais le triple quadripôle est l'analyseur le plus courant. Le mode de détection choisi est celui qui offre la meilleure sensibilité à savoir le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Certaines méthodologies ont été proposées utilisant le Q-Tof<sup>357</sup> ou l'Orbitrap<sup>TM358</sup> ou plus récemment la mobilité ionique<sup>359,360</sup>. En plus du temps de rétention, ces spectromètres apportent une dimension supplémentaire (mobilité ionique, haute ou ultra-haute résolution) pour faciliter la discrimination des différentes espèces moléculaires.

Le second résultat important de ce travail est d'avoir établi une corrélation entre la diminution d'efflux du cholestérol induite par l'addition d'EPA et le rapport des intensités brutes des variables discriminantes identifiées grâce à la réalisation d'une PLS-R. Une seule composante a été calculée pour modéliser les variations de l'impact de l'EPA sur l'efflux, avec une bonne variance de régression et une bonne capacité de prédiction. Les influences des variables sur les Y (ou poids) sont directement interprétables lorsqu'un modèle présente une seule variable latente. La prédiction a été effectuée sur

des données obtenues à distance de l'acquisition des données d'apprentissage. L'écart observé entre l'effet de l'EPA sur l'efflux prédit et les valeurs expérimentales est de moins de 10 %. Dans le contexte de l'étude, cette incertitude est considérée comme acceptable. En effet, les étapes de culture allant de la séparation des monocytes du sang total jusqu'à leur différenciation en macrophages nécessitent 10 à 12 jours avant de débiter l'expérimentation proprement dite qui est réalisée sur trois jours. Ceci explique le nombre relativement limité d'observations présentes dans le set d'apprentissage et de prédiction.

A partir de l'ensemble des résultats ( $n = 20$ ), la diminution de l'efflux du cholestérol se situe entre 19,9 et 30,0 % pour un risque de 5 % ; ( $m = 24,9$  ;  $SD = 11,52$ ). Cet intervalle de confiance est calculé à partir des valeurs obtenues lors de cette thèse (9 mesures de l'impact de l'EPA sur l'efflux du cholestérol) et de 11 expériences antérieures, obtenues par l'équipe de biologie du Lip(Sys)<sup>2</sup>. Ces résultats ont été acquis dans les mêmes conditions de culture cellulaire et mesurés avec les mêmes détecteurs à scintillation. Ces vingt mesures sont donc comparables. Le modèle de prédiction de l'efflux du cholestérol montre qu'il est beaucoup moins performant pour prédire les efflux correspondant à de faibles valeurs de diminution d'efflux (Donneurs 1 et 7 du DS1). Ce faible impact de l'EPA sur l'efflux du cholestérol correspond à des valeurs qui ne sont pas comprises dans l'intervalle de confiance calculé précédemment. Expérimentalement, les raisons de cette absence d'effet sont difficilement attribuables bien qu'il soit possible d'évoquer différentes causes comme un effet donneur, le lot de l'ApoA1 ou encore les réactifs utilisés dans les cultures cellulaires (EPA). En résumé, lorsque que l'EPA diminue faiblement l'efflux du cholestérol, il faut évoquer d'autres mécanismes que la modification des profils phospholipidiques. Ainsi la modélisation effectuée n'est pas en surapprentissage. Par ailleurs, une partie de la variabilité des données est lissée par le calcul des différentes moyennes : intensité des variables discriminantes et efflux du cholestérol. La mesure radioisotopique de l'efflux du cholestérol présente des variations qui sont principalement imputables aux donneurs et aux conditions expérimentales. C'est pourquoi l'impact de l'EPA sur l'efflux du cholestérol est exprimé en comparant le niveau d'efflux des cellules témoins par rapport aux cellules traitées (EPA). Le pourcentage obtenu permet de comparer les différentes expériences.

Concernant les acquisitions LC-MS, des répétitions analytiques ont été effectuées pour chaque échantillon. Dans la modélisation de l'efflux du cholestérol par PLS-R, seule la moyenne des intensités des variables discriminantes pour chaque échantillon a été considérée dans le calcul des ratios. On peut effectivement observer que l'analyse non supervisée des données NP-LC-MS montre que la variabilité du système analytique peut être considérée comme faible. En effet, le tracé des scores de la Figure 71 (A) montre que ces répétitions sont dans une zone du graphique proche (exemple : T3-1 et T3-2 signifie que l'on considère les échantillons témoins issus de la poche 3 et respectivement les répétitions analytiques 1 et 2). De plus, au vu des observations faites précédemment

concernant la mesure de l'efflux du cholestérol, il est nécessaire de faire correspondre un même Y aux différents ratios calculés concernant les X. Cette association des X et des Y est particulièrement problématique concernant la prédiction de l'efflux lorsque l'on prend en compte les données des répétitions analytiques.

Une normalisation PQN a été réalisée sur le DS2 afin de pouvoir corriger les dérives observées concernant les intensités des variables discriminantes. Différentes stratégies peuvent être adoptées pour normaliser les données de métabolomique. En effet, ces techniques de correction du signal visent à diminuer les sources de variances qui sont présentes dans les données brutes et qui masquent les variations de concentration des métabolites. Ces dérives peuvent être classées en deux catégories : les sources de variances à court terme ou « intra-batch » et les sources de variances à long terme ou « inter-batch ». Typiquement en spectrométrie de masse, il est reconnu que la performance de la source d'ionisation à pression atmosphérique baisse au cours d'une longue série d'échantillons (variation intra-batch). Si une série d'échantillons est analysée avec une semaine, un mois ou une année d'écart, il est certain que l'étalonnage du spectromètre ou les différentes maintenances ont modifié ces performances. Ici, on ne considère que la source de variance inter-batch puisque le DS1 et DS2 ont été acquis avec 20 mois d'écart. Comme le nombre d'échantillons analysés au cours d'une séquence n'exécède jamais la centaine d'échantillons (DS1 : 80 échantillons correspondant à 2,5 jours d'analyse), la dérive intra-batch est négligée<sup>361</sup>.

La technique de normalisation la plus simple est de corriger le signal en calculant l'intensité totale ou la médiane pour chaque molécule. L'hypothèse de ce calcul est que le motif de dérive de chaque métabolite est le même pour l'ensemble des échantillons. Cette condition n'est malheureusement pas souvent vérifiée<sup>362,363</sup>. Cela est particulièrement vrai lorsque l'on considère des données NP-LC-LTQ-Orbitrap™. En effet, les PL sont ici séparés en fonction de leur classe et il existe de nombreuses coélutions au sein de chaque classe. La suppression d'ionisation entre les différents PL de chaque classe est un phénomène important : ainsi pour chaque groupe d'échantillons les facteurs de réponse de chaque métabolite sont différents. Par ailleurs, nous avons vu précédemment au cours du chapitre 3 que la normalisation moyenne après déconvolution du signal était particulièrement délétère concernant l'information discriminante lors d'une analyse non ciblée des profils phospholipidiques.

Une seconde option est d'utiliser un ou plusieurs standards internes. Cette méthode est particulièrement robuste et très souvent utilisée notamment lors d'études quantitatives. Elle est considérée comme la méthode de référence. Dans le domaine de la lipidomique, les étalons internes utilisés peuvent être des lipides deutérés ou des dérivés N-trifluoroacétylés, relativement coûteux<sup>364-366</sup>. Il aurait pu être envisagé comme solution alternative d'ajouter un PL qui n'est pas contenu dans les échantillons, notamment un PL à chaîne courte et avec des AG à nombre impair de carbone.

Néanmoins, cette méthodologie n'a pas été retenue. La principale raison a déjà été évoquée et concerne notamment les phénomènes de suppression d'ionisation et le mode de chromatographie utilisé.

Une autre possibilité plus récemment décrite consiste à recourir à des contrôles de qualité analysés plusieurs fois au cours de la séquence afin de pouvoir suivre l'évolution des intensités des métabolites. Il peut être constitué d'un mélange de l'ensemble des échantillons de l'étude ou établi à partir d'une matrice biologique commerciale<sup>367</sup>. Le principal critère de ce contrôle de qualité est d'être représentatif des échantillons. Le biais analytique est alors modélisé à partir des intensités des espèces moléculaires du contrôle de qualité. Une des techniques la plus couramment citée a été proposée par Dunn et *al* et utilise l'algorithme « LOcally Estimated Scatterplot Smothing » ou LOESS<sup>368</sup>. A partir de ce protocole d'autres méthodes d'ajustement ont été proposées<sup>369</sup>. Ce modèle de régression est principalement utilisé pour corriger les biais intra-batch même si certains auteurs ont étendu cette méthode afin de corriger les données provenant de plusieurs lots<sup>370</sup>. La principale réserve concernant ces méthodes est qu'il faut prélever une partie de l'échantillon à analyser, ce qui est gênant concernant les échantillons de HMDM qui sont particulièrement longs à obtenir et qu'avec la quantité de biomasse recueillie il faut pouvoir procéder à l'analyse LC-MS et GC-MS des échantillons. Par ailleurs, la fabrication du contrôle de qualité est problématique lorsque les études sont constituées de plusieurs centaines d'échantillons.

Au cours de cette étude, des contrôles de qualité ont été préparés à partir de mélanges commerciaux de PL. Les données de ces contrôles ont été utilisées pour effectuer la quantification des différentes classes de PL et évaluer les fenêtres des temps de rétention de chaque classe. Un tel mélange n'est pas représentatif des échantillons biologiques et il ne peut donc pas servir à la correction du signal LC-MS. Néanmoins, des mélanges d'échantillons biologiques ont été préparés durant l'acquisition du DS1. Ces échantillons n'ont pas été utilisés pour corriger le biais analytique inter-batch. En effet, ce contrôle a été préparé à partir de mélanges d'extraits de macrophages témoins et EPA mais aussi à partir d'échantillons de macrophages surchargés en cholestérol (macrophages spumeux). Les résultats de la lipidomique des macrophages spumeux seront présentés dans le chapitre 6. D'un point de vue qualitatif et quantitatif, ce contrôle de qualité n'a pu être utilisé pour corriger les données.

La méthode de correction du signal, en utilisant le coefficient le plus probable ou correction PQN, a été présentée afin d'éliminer les sources de variation du signal RMN provenant de la différence de concentration des échantillons biologiques<sup>330</sup>. Le principe du calcul consiste à normaliser les données avec la médiane des rapports entre chaque point du spectre à corriger et le spectre de référence<sup>371</sup>. D'une façon générale, PQN corrige les variations du signal incontrôlables ou imputables

aux conditions d'acquisition des données<sup>372</sup> (température lors d'acquisition spectrale dans le proche infrarouge<sup>373</sup>, différence de concentration des échantillons<sup>374</sup>, variation inter-batch du signal LC-MS). Dans cette étude, cet algorithme a été appliqué aux données de NP-LC-LTQ-Orbitrap™ afin de pouvoir réaliser la prédiction de l'impact de l'EPA sur l'efflux du cholestérol à partir des ratios des intensités des variables discriminantes. Le spectre de référence correspond aux intensités médianes de chaque métabolite discriminant du DS1.

Ainsi avec ces méthodes de traitement de l'information, nous observons que les PL ayant le plus fort impact sur l'augmentation de la différence d'efflux entre les HMDM témoins et EPA sont  $m/z$  PI (18:0/22:5) et  $m/z$  808,51 ; PS (18:0/20:5) PS (16:0/22:5) qui sont surexprimées dans les HMDM EPA. Il est remarquable de constater qu'à partir de 1832 variables, celles reliées à la variation d'efflux du cholestérol induite par l'EPA correspondent aux deux classes de PL anioniques. Il est aussi à noter que la simple détermination des classes de PL, qui ne varient pas entre les deux modèles cellulaires, n'a pas permis d'évoquer le rôle de la PS ou du PI dans l'altération de l'efflux. C'est la mesure des espèces moléculaires et l'analyse chimiométrique des résultats qui révèlent leur importance potentielle. Les PS et les PI sont des PL constitutifs de la membrane des cellules, en particulier au niveau du feuillet interne mais qui, après le phénomène de flip-flop, peuvent aussi être présents sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Au sein de la membrane, ces deux classes de PL influencent la localisation des protéines au niveau de microdomaines via des interactions, notamment électrostatiques, protéines-lipides ou facilitent des interactions spécifiques protéines-protéines ainsi que les signaux cellulaires résultant de ces interactions<sup>339,375</sup>. Le mécanisme d'action de l'ABCA1 comme transporteur de PL et de cholestérol vers l'apoAI fait toujours l'objet de débats, deux mécanismes étant proposés : *i*) l'ABCA1 lie directement le ligand apoAI ce qui déclenche l'efflux des lipides, *ii*) l'apoAI ne se lie pas directement au transporteur mais à des microdomaines membranaires situés à proximité de l'ABCA1 permettant ainsi une interaction entre les deux protéines aboutissant à l'efflux du cholestérol et des PL. Il a été montré que l'ABCA1 possède une activité floppase vis-à-vis de la PS entraînant son augmentation dans le feuillet externe de la membrane facilitant la fixation de l'apoAI et une augmentation de l'efflux. Il est nécessaire que la fonction ATPasique du transporteur soit intacte<sup>376,377</sup>. Au contraire, d'autres auteurs constatent que l'induction de l'expression de l'ABCA1 dans la membrane cellulaire s'accompagne d'une faible augmentation de PS à la surface cellulaire. Celle-ci n'est pas suffisante pour permettre la fixation de l'apoAI qui se lie préférentiellement au transporteur<sup>305,378</sup>. Il est à souligner que, dans les travaux précités, le rôle éventuel d'une autre classe de PL n'a pas été étudié. Le rôle de la PS est donc controversé et si nos résultats ne permettent pas de clore ce débat, nous observons néanmoins que la surexpression de deux espèces moléculaires de PS s'oppose à l'effet inhibiteur de l'efflux du cholestérol provoqué par l'addition d'EPA sans toutefois empêcher une altération nette de cette fonction, le remodelage de la PI ayant un rôle prépondérant.

Concernant le PI, une caractéristique de ce PL est que l'inositol qui le compose peut être phosphorylé à différentes positions (3 et/ou 4 et/ou 5) ce qui donne plusieurs espèces appelées phosphoinositides qui sont au nombre de 7, localisées dans des compartiments subcellulaires différents en fonction des actions concertées de PI-kinases et de PI-phosphatases (Figure 73).

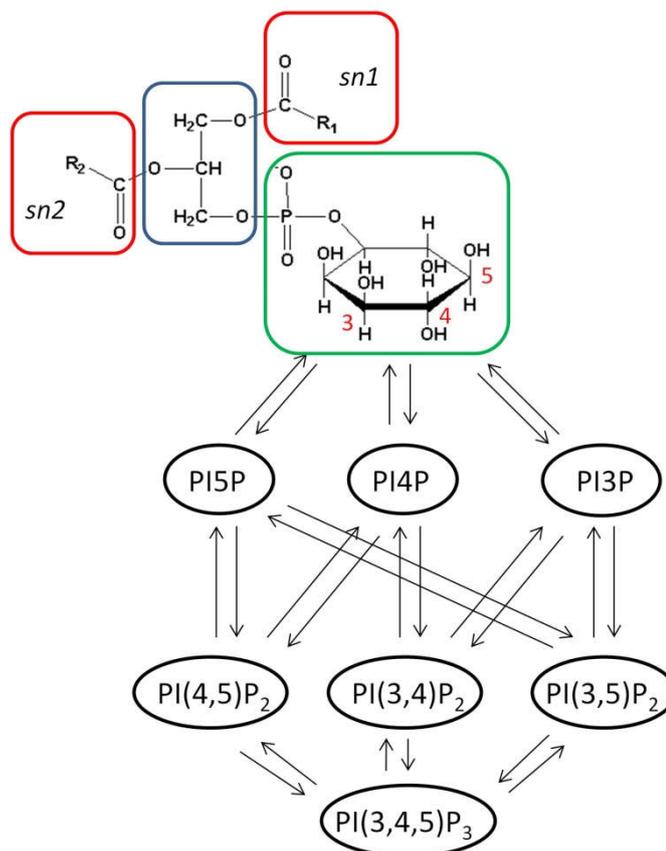


Figure 73 : Structure générale d'un phosphatidylinositol et les phosphoinositides correspondants

Sont ainsi localisés dans la membrane plasmique des cellules le PI, la forme monophosphorylée en position 4 (le PI4P) et la forme diphosphorylée PI(4,5)P<sub>2</sub> (ou PIP<sub>2</sub>). Ce sont les phosphoinositides produits dans la cellule qui contrôlent un très vaste ensemble de processus cellulaires en interagissant avec des cibles en aval possédant des motifs de liaison des phosphoinositides<sup>379</sup>. En terme de composition en AG, l'espèce moléculaire de PI la plus abondante dans les cellules, cette abondance variant toutefois fortement en fonction du tissu ou des types cellulaires, est le PI (18:0/20:4) qui est une des espèces moléculaires surexprimées dans nos HMDM témoins<sup>379,380</sup>. L'enrichissement chronique en EPA provoque une modification importante des espèces moléculaires de PI avec, comme nous l'avons vu, 4 espèces surexprimées portant de l'EPA ou du DPA en position *sn*2 (Tableau 23). Les analyses chimiométriques ont permis de montrer que l'espèce moléculaire la plus discriminante était celle possédant le DPA en position *sn*2 (PI 18:0/22:5)<sup>379,380</sup>. Ce remodelage des PI pourrait avoir deux conséquences. Comme évoqué précédemment, le remplacement de l'AA par de l'EPA ou ses produits d'élongation pourrait libérer dans la cellule une quantité non

négligeable d'AA et ainsi modifier le métabolisme des eicosanoïdes<sup>12</sup>. La seconde conséquence pourrait être que l'action des kinases sur cette espèce moléculaire de PI puisse être altérée ou que la formation de PI(4,5)P<sub>2</sub> possédant du DPA ait un fonctionnement modifié ce qui pourrait expliquer le lien avec la diminution d'efflux du cholestérol que nous observons. En effet, un travail publié très récemment a cherché à déterminer quels lipides présents à la surface de cellules exprimant l'ABCA1 permettaient de lier l'apoAI et ainsi d'assurer l'efflux du cholestérol et des PL vers cet accepteur<sup>381</sup>. Les auteurs ont tout d'abord montré à l'aide de systèmes acellulaires (utilisation de bandes (strips) recouvertes de lipides différents) que la seule classe de lipides capables de fixer l'apoAI étaient les formes bi et triphosphorylées de PI à l'exclusion de tout autre lipide et notamment de la PS. Ils ont ensuite utilisé une lignée de macrophages de Souris, les RAW 264.7, traitée par de l'AMPc afin que les cellules expriment l'ABCA1 à la surface de leur membrane. L'expression de l'ABCA1 provoque l'apparition du PI(4,5)P<sub>2</sub> au niveau du feuillet externe de la membrane permettant ainsi la liaison de l'apoAI et l'efflux du cholestérol. L'ABCA1 a donc une activité floppase pour le PI(4,5)P<sub>2</sub> assurant le passage de ce phosphoinositide du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane. L'analyse des espèces moléculaires de PI(4,5)P<sub>2</sub> retrouvées liées à l'apoAI révèle la présence de seulement 2 espèces moléculaires composées des AG 18:0/20:4 et 16:0/20:4<sup>381</sup>. En relation avec nos résultats, nous pouvons émettre comme hypothèse que le remodelage important induit par l'addition d'EPA avec la surexpression de l'espèce moléculaire PI (18:0/22:5) perturbe l'activité floppase de l'ABCA1 et/ou que cette espèce moléculaire de PI ne permette pas une liaison suffisante de l'apoAI à la membrane. La conséquence serait la diminution de l'efflux du cholestérol que nous observons. Ceci ouvre comme perspective de cibler l'étude des modifications de la composition et du métabolisme des phosphoinositides des macrophages humains dans nos conditions opératoires.

L'analyse des PI phosphorylés nécessite un protocole d'extraction dérivé de la méthode de Folch mais il est nécessaire de travailler en milieu acide pour éviter l'ionisation des groupements phosphates. De plus, une étape de dérivation est nécessaire en utilisant du TMS-diazométhane correspondant à une réaction de méthylation sur les groupements phosphorylés de l'inositol. En effet, les PI phosphorylés sont particulièrement labiles et présentent des difficultés d'ionisation en spectrométrie de masse<sup>382</sup>.

## 5 Conclusion

Notre laboratoire avait lors d'un travail précédent montré le rôle délétère de l'enrichissement en EPA de la membrane des macrophages humains sur leur capacité à céder leur cholestérol et identifié le mécanisme responsable<sup>282</sup>. Le premier objectif de ce travail était d'identifier les espèces

moléculaires potentiellement modifiées dans ces conditions expérimentales, objectif rempli grâce à l'utilisation de techniques de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse permettant une analyse phospholipidomique sans *a priori*. Le second objectif était de pouvoir essayer de relier ces résultats de lipidomique à la diminution de l'efflux du cholestérol. Ce second objectif a lui aussi été atteint grâce à l'analyse chimiométrique d'une matrice de 1832 variables permettant d'identifier dans nos modèles seulement quelques espèces moléculaires de PL surexprimées dans nos conditions expérimentales. Le traitement statistique de ces données a enfin réussi à identifier trois espèces moléculaires de PL les plus fortement reliées à l'altération de l'efflux du cholestérol ABCA1-dépendant dont l'espèce moléculaire PI (18:0/22:5) est la plus discriminante. Ce résultat apporte la preuve de l'intérêt d'associer des méthodologies analytiques et chimiométriques à l'élucidation de problématiques biologiques.

**Chapitre 6 : Etude de l'impact d'acides gras polyinsaturés sur la composition des phospholipides de macrophages humains spumeux et identification des mécanismes biochimiques de la diminution d'efflux du cholestérol**

# **1 Etude de l'impact de l'incorporation d'acide gras $\omega$ 3 sur les phospholipides de macrophages humains spumeux**

Les études précédentes ont montré que l'incorporation de l'EPA dans les membranes cellulaires de macrophages humains (HMDM) entraînait des modifications de la composition des PL membranaires avec pour conséquence une altération du fonctionnement de l'ABCA1, protéine membranaire jouant un rôle-clé dans l'efflux du cholestérol cellulaire. Le modèle cellulaire choisi était constitué de macrophages au contenu normal en cholestérol dont l'expression de l'ABCA1 était stimulée par l'addition d'agonistes des facteurs de transcription LXR/RXR reproduisant ainsi la régulation produite par un excès de cholestérol cellulaire. Toutefois, la caractéristique d'une plaque d'athérosclérose est la présence de macrophages gorgés de cholestérol appelés cellules spumeuses qui se forment lors de la capture non régulée de LDL modifiées. L'excès de cholestérol est estérifié par l'action de l'acyl-CoA-cholesterol acyl transferase (ACAT) et stocké sous forme de gouttelettes lipidiques (lipid droplets ou LD) riches en esters de cholestérol (EC). La seule possibilité qu'ont ces cellules spumeuses de se débarrasser de leur cholestérol est de le céder à un accepteur extracellulaire lors de l'étape d'efflux. Comme seul le cholestérol libre ou non estérifié (CNE) peut être pris en charge par un accepteur, il est nécessaire que les EC des gouttelettes lipidiques soient hydrolysés en CNE. Cette étape d'hydrolyse est considérée comme l'étape limitante de l'efflux du CNE des cellules spumeuses. L'objectif de cette partie de la thèse est d'apprécier les conséquences de la modification de la composition des PL membranaires par l'EPA sur la capacité d'efflux de macrophages humains surchargés en cholestérol et de comparer cet impact avec celui obtenu sur les macrophages au contenu normal en cholestérol <sup>47</sup>.

## **2 Matériel et méthodes**

### **2.1 Cultures cellulaires**

Les monocytes ont été isolés à partir de sang total de sept donneurs normolipidémiques (Etablissement français du sang) par gradient Ficoll puis différenciés en macrophages par adhésion sur support plastique Primaria<sup>®</sup> 24 puits durant une période de 11 jours dans un milieu de culture composé de RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de SVF, des antibiotiques (pénicilline-streptomycine) et 20 ng.mL<sup>-1</sup> de hM-CSF (human macrophage- colony stimulating factor).

Pour apprécier l'impact de l'EPA, les macrophages humains sont ensuite incubés dans le milieu de culture (SVF 10%) en présence ou non (cellules témoins) de  $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$  d'EPA, comme précédemment décrit dans le chapitre 5. Les HMDM sont ensuite surchargés en cholestérol en les incubant 24 heures en présence de  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  de LDL acétylées (LDLac) dans le milieu de culture (SVF 10%) additionné (groupe EPA/LDL) ou non (groupe LDL) d'EPA. Cette étape est suivie d'une période d'équilibration de 16 heures dans le milieu de culture sans SVF contenant 0,2 % d'albumine bovine et des agonistes de LXR/RXR pour favoriser l'expression de l'ABCA1. Les cellules surchargées en cholestérol sont alors prêtes pour la suite des expérimentations biologiques ou analytiques.

L'efflux isotopique est mesuré après le marquage des pools de cholestérol, lors des 24 heures de surcharge par les LDLac en ajoutant du cholestérol tritié ( $1\mu\text{Ci/puits}$ ) au milieu de culture supplémenté ou non en AG et contenant 10% de SVF. Après l'étape d'équilibration, les HMDM surchargés en cholestérol et surexprimant l'ABCA1 sont incubés dans du RPMI seul ou en présence d'apoAI ( $15 \mu\text{g/ml}$ ) pendant 4 ou 24 heures.

Sept poches de sang ont été utilisées pour réaliser les profils lipidomiques des groupes de cellules suivants : les HMDM témoins (NT), les HMDM enrichis en cholestérol par l'addition de LDL acétylées (LDL) et les HMDM enrichis en EPA et en cholestérol (EPA/LDL).

## 2.2 Réactifs et méthodes d'analyse

Les réactifs, méthodes d'extraction des lipides et les analyses lipidomiques qualitative et quantitative sont identiques à celles décrites dans le chapitre 4.

Concernant le traitement des données, le protocole présenté ici est similaire à celui décrit dans le chapitre 5 paragraphe 2.6.1. Après le chargement des fichiers du format « .raw », l'ensemble des données a été soumis aux différentes étapes du prétraitement (construction du chromatogramme, alignement et remplissage des données manquantes) sur MzMine 2.25. Il en résulte une matrice de données avec 1832 variables et 41 injections : 14 pour les extraits lipidiques issus de cellules témoins et celles ayant reçu des LDL acétylées (groupe LDL) et 13 pour les extraits lipidiques ayant reçu de l'EPA et des LDL acétylées (groupes EPA/LDL).

Le même type de traitement de données a été effectué afin de déterminer s'il existe des relations entre la diminution de l'efflux radioisotopique du cholestérol et les modifications des profils

lipidiques entre les macrophages spumeux (LDL) et les macrophages spumeux enrichis en EPA (EPA/LDL).

### **3 Résultats**

#### **3.1 Quantification des classes lipidiques par NP-LC-détecteur à aérosol chargé**

Comme le montre la Figure 74, les compositions relatives en PL ne sont pas modifiées par l'addition de LDL acétylées et/ou d'EPA. Le PL majoritaire est la PC (entre 45,7 % pour le groupe EPA/LDL et 47,2 % pour les cellules témoins) suivie des PE (entre 23,8 % pour le groupe EPA/LDL et 22 % pour les cellules témoins) puis les PS (7,4 ; 7,8 et 8,9 % respectivement pour les groupes EPA/LDL, témoins et LDL) et les PI représentent pour les trois groupes 5 % des PL totaux. Les SM presque 19 % des PL détectés.

Les LPE et les LPC ne sont pas reportées dans les données de quantification pour les mêmes raisons que celles décrites dans le chapitre précédent. Les CL, PA et PG ne sont toujours pas mis en évidence en utilisant les profils chromatographiques avec le détecteur à aérosol chargé.

L'analyse chimométrique des données NP-LC-LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup> est effectuée afin de détecter les différences de composition des espèces moléculaires entre les différents groupes.

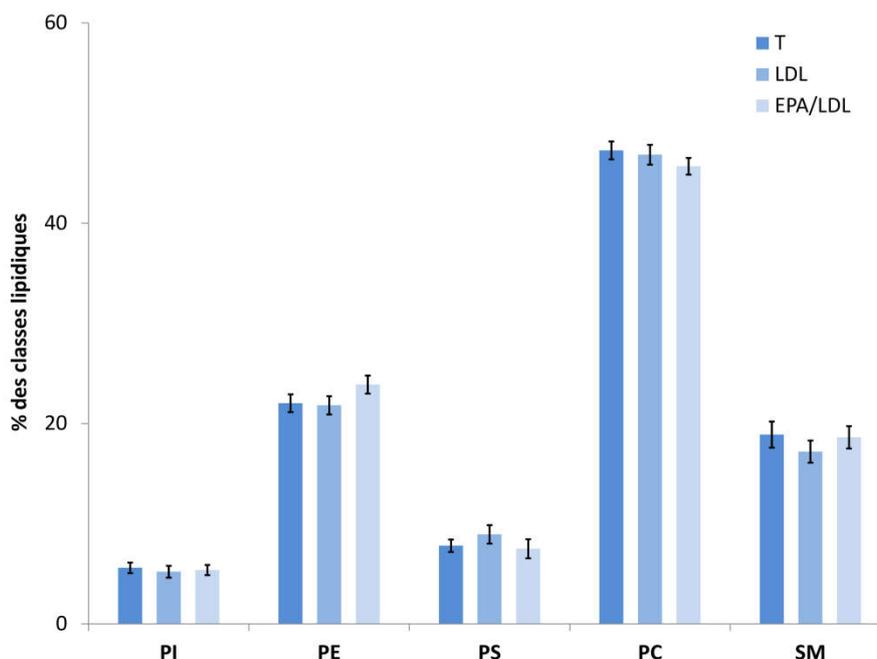


Figure 74 : Composition relative des différentes classes phospholipidiques obtenues par NP-LC-Corona entre les cellules témoins, les cellules surchargées en cholestérol (LDL) et les cellules surchargées en cholestérol et supplémentées avec de l'EPA 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$

### 3.2 Analyses chimiométriques NP-LC-LTQ-Orbitrap™

La Figure 75 (A) montre le tracé des scores des échantillons suivant les deux premières composantes principales procédant d'une analyse en composante principale. La variance expliquée ( $R^2X$ ) est respectivement de 0,346 pour la première composante et de 0,190 pour la deuxième. La capacité de prédiction pour ces deux composantes est de 0,465 ( $Q^2$  cumulés). On observe qu'il est assez difficile de distinguer des groupes bien individualisés, en particulier pour les cellules témoins et les cellules surchargées en cholestérol. Cependant on peut noter qu'il existe une certaine individualisation des cellules ayant reçu de l'EPA et des LDLac suivant la deuxième composante.

L'analyse en PLS-DA, Figure 75 (B), confirme les observations de l'analyse en composantes principales. La variance expliquée de ce modèle est respectivement de 0,384 et de 0,199 ( $R^2Y$ ) pour les deux premières composantes. La capacité de prédiction pour ces deux composantes ( $Q^2$  cumulés) est de 0,479. On observe que la première composante permet de séparer le groupe EPA/LDL des macrophages témoins et des cellules surchargées. Par ailleurs, les cellules témoins et LDL sont plutôt situées dans la même zone du score plot.

Dans ce contexte deux modèles d'OSC-PLS-DA sont construits. Le premier consiste à comparer les profils LC-MS des PL des cellules témoins et des cellules surchargées en cholestérol

(témoins *versus* LDL), l'objectif étant d'observer si la surcharge en cholestérol entraîne des modifications qu'il faudrait prendre en compte lors de l'étude de l'impact de l'EPA sur des HMDM surchargés. Le second modèle est la comparaison des cellules surchargées en cholestérol et celles ayant reçu dans le milieu de culture à la fois des LDLac et  $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$  d'EPA.

Les Figure 75 (C et E) montrent le tracé des scores respectivement pour le modèle témoins *versus* LDL et LDL *versus* EPA/LDL. On observe que la première composante permet de séparer les différents groupes pour ces deux modèles. Pour le modèle témoins *versus* LDL le  $R^2(Y)$  de la première composante est de 0,723 avec une capacité de prédiction de  $Q^2$  de 0,543. Ces valeurs sont acceptables mais on observe que deux injections sont en dehors du cercle d'Hotelling. Cependant ce modèle est conservé pour étudier les variables responsables des différences observées.

Concernant le modèle LDL *versus* EPA/LDL, le tracé des scores montre une bonne séparation des groupes selon la première composante. La variance expliquée ( $R^2Y$ ) est de 0,881 avec une bonne capacité de prédiction de 0,871 ( $Q^2$  cumulés). Les différentes variables discriminantes sont sélectionnées à partir du diagramme de variance-covariance.

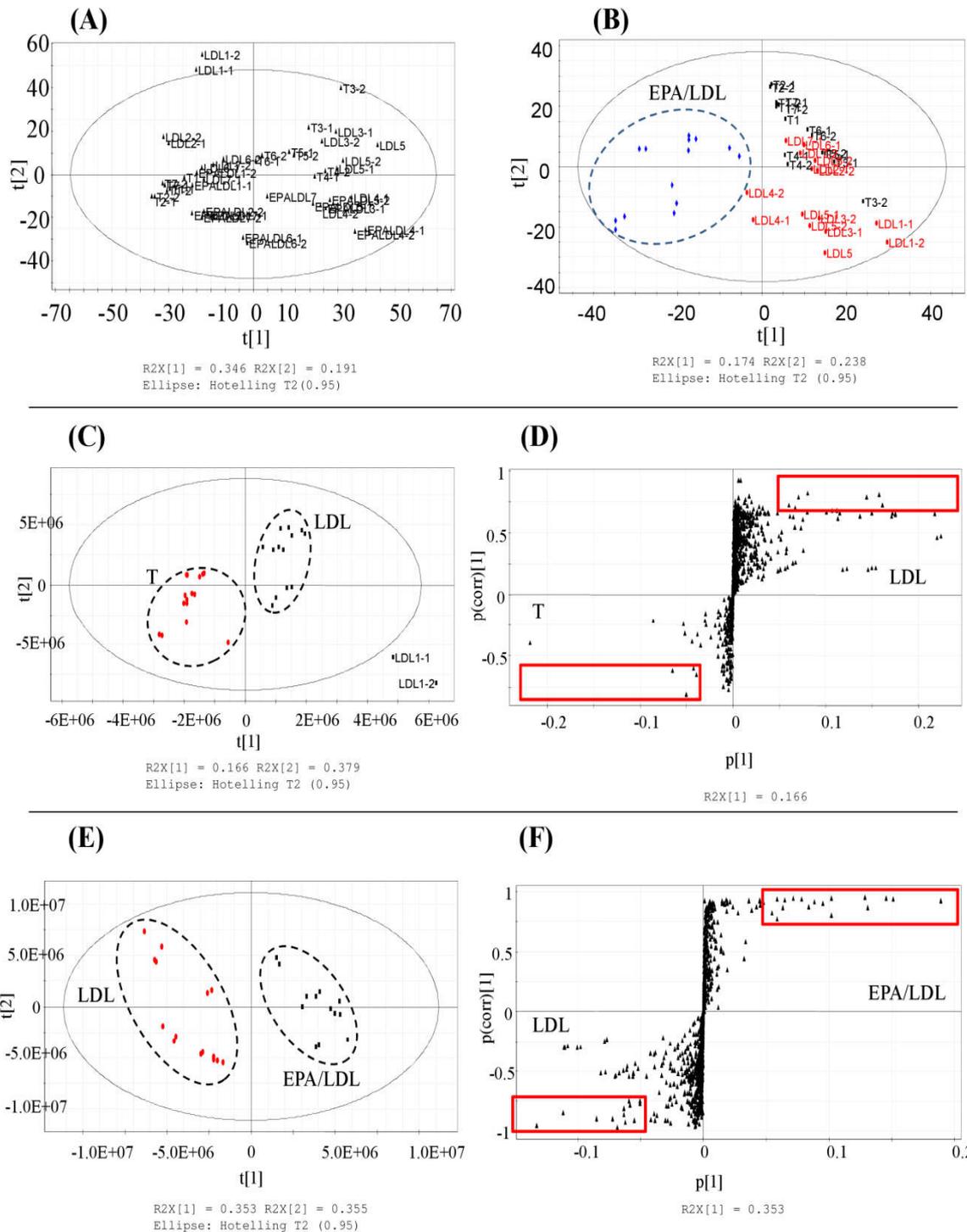


Figure 75 : (A) Tracé des scores de l'analyse en composante principale des échantillons correspondant aux cellules témoins (T), cellules surchargées en cholestérol (LDL) et celles incubées en présence d'EPA et de LDLac (EPA/LDL) EPA et LDL-cholestérol, (B) Tracé des scores des échantillons T, LDL, EPA/LDL analysé en PLS-DA, (C) Tracé des scores des échantillons témoins et LDL suivant le modèle d'OSC-PLS-DA, (D) Tracé du diagramme de variance-covariance correspondant au modèle témoins *versus* LDL analysé en OSC-PLS-DA, (E) Tracé des scores des échantillons LDL et EPA/LDL suivant le modèle d'OSC-PLS-DA, (F) Tracé du diagramme de variance-covariance correspondant au modèle LDL *versus* EPA/LDL analysé en OSC-PLS-DA

### 3.2.1 Identification des espèces lipidiques responsables des différences observées entre les cellules témoins et les cellules surchargées en cholestérol

Le Tableau 27 résume les différentes variables identifiées comme discriminantes entre le groupe des cellules témoins (T) et celui des cellules surchargées en cholestérol (LDL). Ces variables sont classées suivant le pourcentage de corrélation. Dans ce modèle il existe peu de variables ayant une corrélation supérieure à 70 % et une covariance supérieure à 5 %. C'est pourquoi, les critères ont été élargis jusqu'à 50 % de corrélation. Par ailleurs, on observe qu'il existe beaucoup plus de variables considérées comme discriminantes dans le groupe cholestérol-LDL.

L'identification des CL reste incomplète. En effet, ces espèces moléculaires ont pour schéma de fragmentation la dissociation en deux acides phosphatidiques puis la MS3 permet d'identifier les groupements AG des acides phosphatidiques. Dans le cadre du profilage des PL, le mode d'acquisition du spectromètre de masse LTQ-Orbitrap™ ne permet pas de fragmenter l'ensemble des acides phosphatidiques résultant de la MS<sup>2</sup>. En effet, seuls les 2 ions les plus intenses du spectre MS<sup>2</sup> sont fragmentés : c'est pourquoi certains ions observés n'ont pas de spectre MS<sup>3</sup>. Cela se produit en particulier lorsque 2 CL ont le même *m/z*.

Adduits observés	<i>m/z</i> ; identification	Corrélation (%)	Covariance (%)
<b>Surexprimés chez LDL</b>			
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	816,59 ; PC (16:0/18:2) PC (16:1/18:1)	80,5	15,8
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	842,60 ; PC (18:1/18:2) PC (16:0/20:3)	78,4	14,4
[M-H]-	786,53 ; PS (18:1)/18:1) PS (18:0/18:2)	78,3	0,6
[M-H]-	1447,97 ; CL (18:2)4	75,0	2,0
[M-H]-	742,53 ; PE (18:1/18:1) PE (18:0/18:2)	72,2	6,0
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	800,55 ; PC (P-16:0/18:2)	61,0	5,1
[M-H]-	1449,98 ; CL (18:2/18:2//18:2/18:1)	60,1	6,3
[M-H]-	1471,96 ; CL (74:10)	58,7	1,4
[M-H]-	859,54 ; PI (18:1/18:2)	57,8	5,8
[M-H]-	1421,95 ; CL (18:2/18:2//16:1/18:2)	57,7	3,9
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	733,57 ; SM (d18:1/14:0)	57,6	4,4
[M-H]-	1249,81 ; GM3 (18:1/23:0)	53,7	4,1
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	824,587 ; PC (P-16:0/20:4)	50,8	4,9
<b>Surexprimés chez les cellules témoins</b>			
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	820,59 ; PC (16:0/18:0)	81,3	5,0
[M-H]-	1399,97 ; CL 68:4	54,5	3,2
[M-H]-	1427,99 ; CL (18:1/18:1 // 16:1/18:1)	50,4	3,3

**Tableau 27 : Coordonnées des variables identifiées dans le modèle cellules témoins versus LDL considérées comme discriminantes**

On observe que la classe qui est la plus fortement impactée par l'addition de LDLac est la cardiolipine. Leurs coordonnées sur le S-plot présente des niveaux de corrélation inférieurs à 60 % le plus souvent sauf pour l'ion  $m/z$  1447,97.

La surcharge par des LDL acétylées provoque un remodelage des PL avec une intégration de l'AG majoritaire des LDL à savoir l'acide linoléique (C18:2). Ce remodelage touche les diacyl-PL, comme l'ion  $m/z$  859,54 ; 742,53 ; 786,52 et 842,60 et les plasmalogènes de PC comme l'ion  $m/z$  800,55. Par ailleurs, on observe une augmentation de l'expression de deux sphingolipides dans le groupe cholestérol-LDL : GM3 (d18:1/23:0) et SM (d18:1/14:0). La Figure 76 représente les niveaux moyens des intensités observées de ces variables discriminantes ainsi que le seuil de significativité des tests univariés concernant la moyenne observée entre les différents groupes.

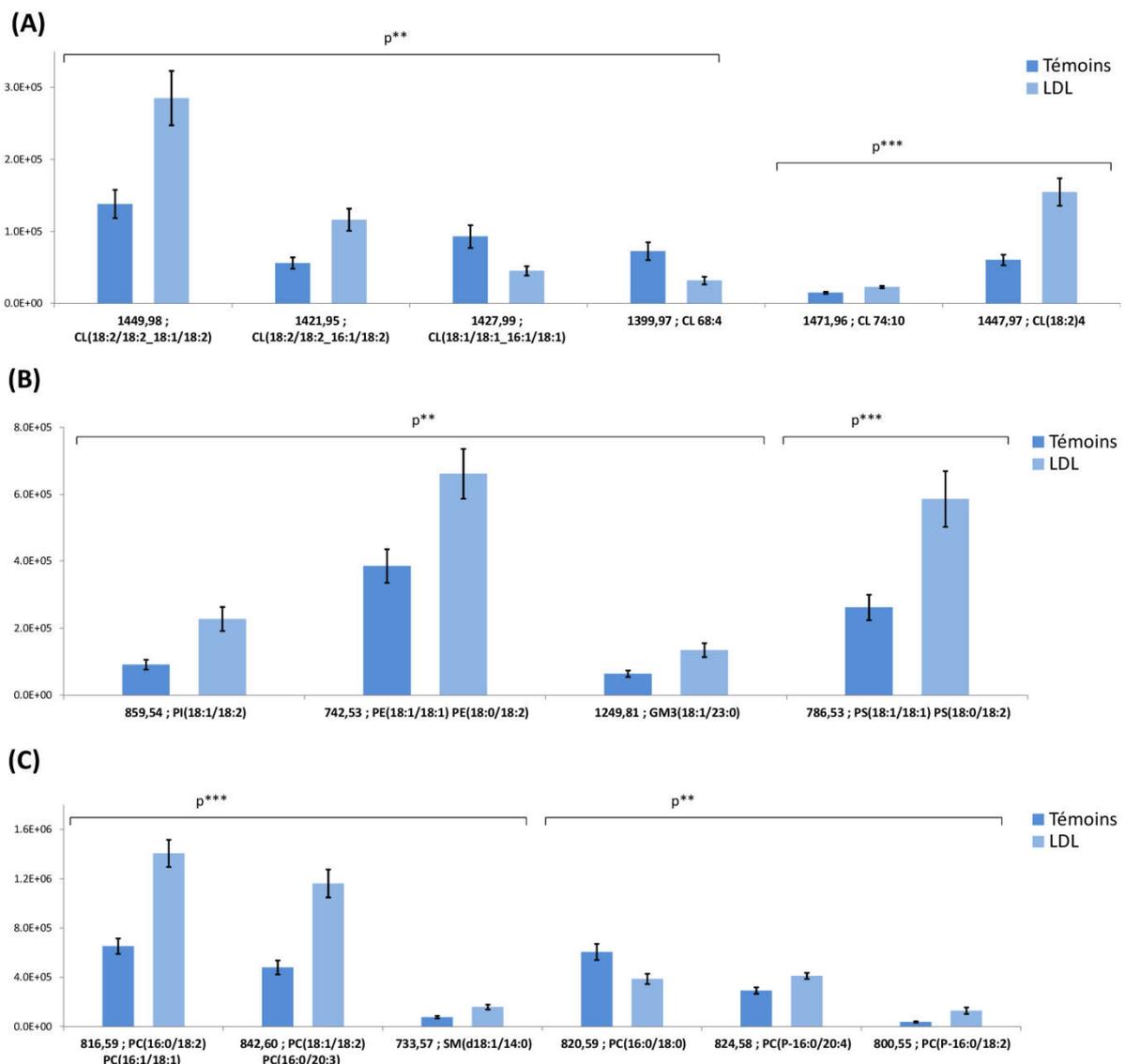


Figure 76 : (A) Cardiolipines, (B) PI, PE, PS et GM3, (C) PC considérées comme discriminantes dans le modèle Témoins versus LDL

### 3.2.2 Identification des espèces lipidiques responsables des différences observées entre les cellules surchargées en cholestérol et les cellules surchargées en cholestérol en présence d'EPA

Le Tableau 28 résume les différentes variables identifiées comme discriminantes lors de l'analyse du S-plot correspondant au modèle OSC-PLS-DA entre EPA/LDL et LDL. De la même façon que dans le paragraphe précédent, les différentes espèces moléculaires sont classées suivant le pourcentage de variance décroissante. En cas d'égalité des variances entre deux variables, la covariance est utilisée pour effectuer ce classement. Dans ce modèle l'ensemble des différentes variables a une corrélation supérieure à 80 % ainsi qu'une covariance supérieure à 1,5 %.

Adduits observés	m/z ; Identification	Corrélation (%)	Covariance (%)
<b>Surexprimés chez EPA/LDL</b>			
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	838,56 ; PC (16:0/20:5)	95,4	12,8
[M-H]-	883,53 ; PI (18 :0/20:5)	94,2	10,2
[M-H]-	764,52 ; PE (18:0/20:5) PE (16:0/22:5)	94,1	14,5
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	866,59 ; PC (18:0/20:5) PC (16:0/22:5)	93,8	15,1
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	864,60 ; PC (18:1/20:5)	93,6	5,8
[M-H]-	720,50 ; PE (P-16:0/20:5)	92,5	18,9
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	822,58 ; PC (P-16:0/20:5)	92,5	4,5
[M-H]-	808,51 ; PS (18 :0/22:5) PS (16 :0/22:5)	92,5	3,6
[M-H]-	881,52 ; PI (18 :1/20:5)	91,7	2,1
[M-H]-	792,55 ; PE (18:0/22:5)	90,5	9,5
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	912,59 ; PC (20:4/22:6)	89,9	1,9
[M-H]-	911,56 ; PI (18:0/22:5)	88,9	4,5
[M-H]-	855,50 ; PI (16:0/20:5)	87,4	2,3
[M-H]-	748,52 ; PE (P-16:0/22:5) PE (P-18:0/20:5)	87,3	8,4
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	792,58 ; PC (16:0/16:0)	86,4	13,1
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	892,59 ; PC (18:1/22:5)	84,3	3,8
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	940,60 ; PC (22:5/22:5)	83,8	1,9
[M-H]-	836,54 ; PS (18:0/22:5)	80,3	10,2
<b>Surexprimés chez les LDL</b>			
[M-H]-	722,51 ; PE (P-16:0/20:4)	95,7	13,3
[M-H]-	887,56 ; PI (18:0/20:3)	95,7	6,2
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	870,58 ; PC (18:0/20:3) PC (18:1/20:2)	91,3	3,1
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	826,57 ; PC (O-16:0/20:4)	90,8	5,5
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	844,60 ; PC (18:1/18:1)	89,9	8,5
[M-H]-	750,54 ; PE (P-18:0/20:4) PE (P-16:0/22:4)	89,5	7,2
[M-H]-	885,55 ; PI (18:0/20:4)	84,7	11,2
[M-H]-	778,60 ; PE (P-20:0/20:4) PE (P-18:0/22:4)	84,6	1,2
[M-H]-	766,54 ; PE (18:0/20:4)	81,5	6,3
[M-CH <sub>3</sub> COO]-	776,58 ; PC (P-16:0/16:0)	80,9	1,7
[M-H]-	1449,98 ; CL (18:2/18:2_18:2/18:1)	80,1	1,7

Tableau 28 : Coordonnées des variables identifiées dans le modèle LDL versus EPA/LDL considérées comme discriminantes

Les ions discriminants observés dans le groupe EPA/LDL sont qualitativement identiques aux ions discriminants observés dans le groupe EPA et présentés dans le chapitre 5. Ainsi, l'addition d'EPA induit une surexpression de PL ayant comme AG en position *sn2* soit de l'EPA (C20:5) soit du DPA (C22:5). Cette modification concerne les diacyl-PL et les éthers-PL. Ainsi, la surcharge ne semble pas entraîner de variations différentes de celles observées dans le modèle des HMDM non surchargés (Figure 77).

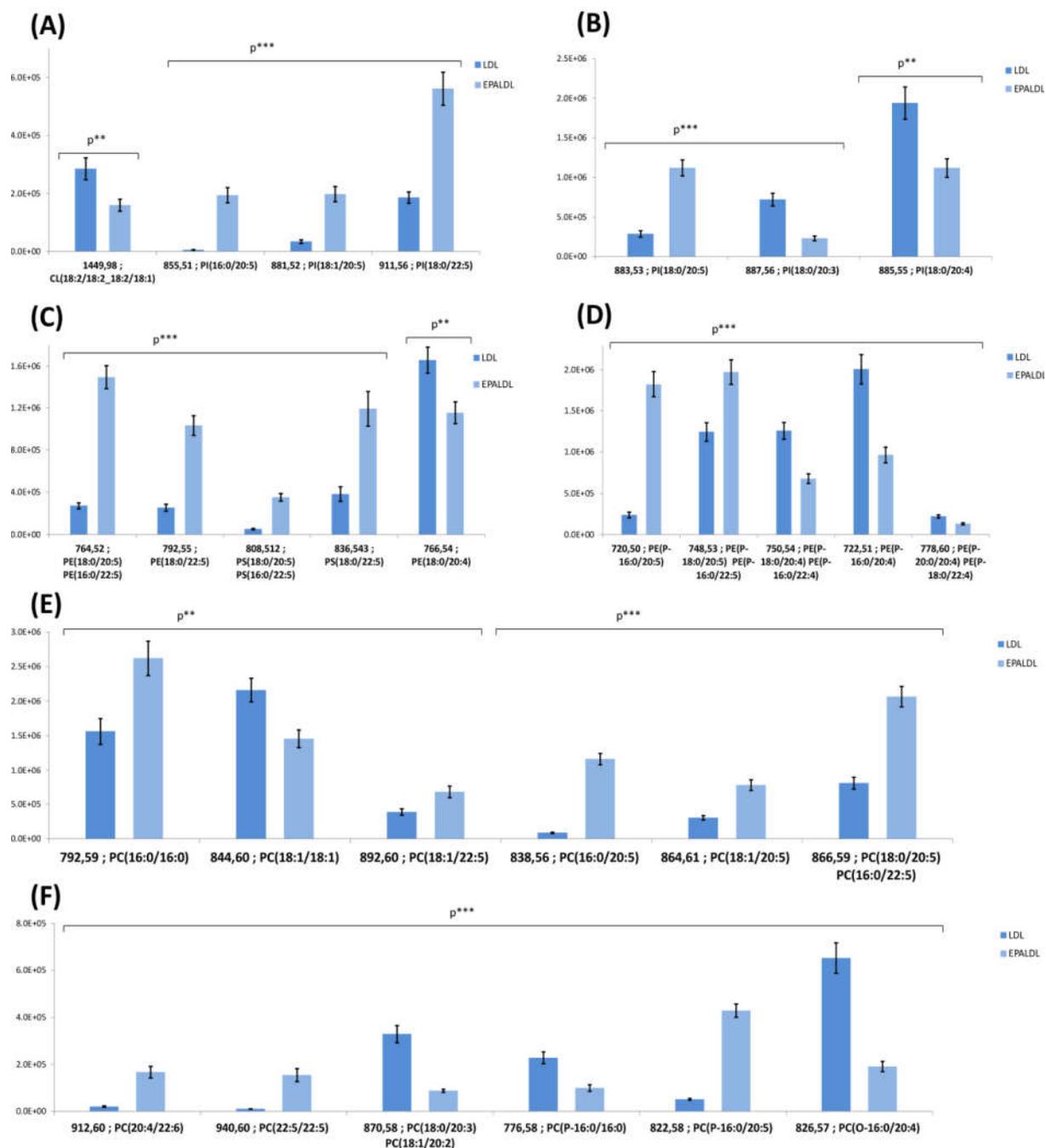


Figure 77 : (A) CL, (B) PE, (C) DiacylIPC, (D) DiacylIPC ayant une intensité inférieure à 4,0 E+05, (E) PE et (F) éther lipides considérées comme discriminantes dans le modèle Témoins *versus* LDL

### 3.2.3 Modélisation de l'efflux du cholestérol en fonction du pourcentage de surexpression des variables discriminantes

Sept mesures de l'efflux du cholestérol ont été effectuées avec des HMDM surchargés en présence d'EPA  $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . En moyenne la diminution d'efflux du cholestérol entre le groupe LDL et le groupe LDL/EPA est de 37,1 %. Cette diminution est du même ordre de grandeur que la diminution d'efflux du cholestérol déterminée dans les mêmes conditions pour les macrophages non surchargés du chapitre précédent (34 %). Néanmoins, il existe une variabilité de l'intensité de la diminution d'efflux du cholestérol en fonction des donneurs.

En effet, la diminution d'efflux du cholestérol est particulièrement importante pour les donneurs 3 et 7 (65,3 % et 46,7 % respectivement), proche de l'effet moyen (35,2 %) pour le donneur 1 ou de l'ordre de 20 % pour les donneurs 4, 5 et 6 (Figure 78). Ainsi, le même type de modélisation présenté dans le chapitre 5 a été effectué sur les données des macrophages surchargés afin de déterminer si la diminution d'efflux du cholestérol peut être imputée à la modification des profils phospholipidiques constatée. Cette modélisation par régression PLS n'a pas montré d'organisation spontanée contrairement aux données concernant les macrophages non surchargés. Le calcul de la première composante montre une faible variance expliquée et une capacité de prédiction négative.

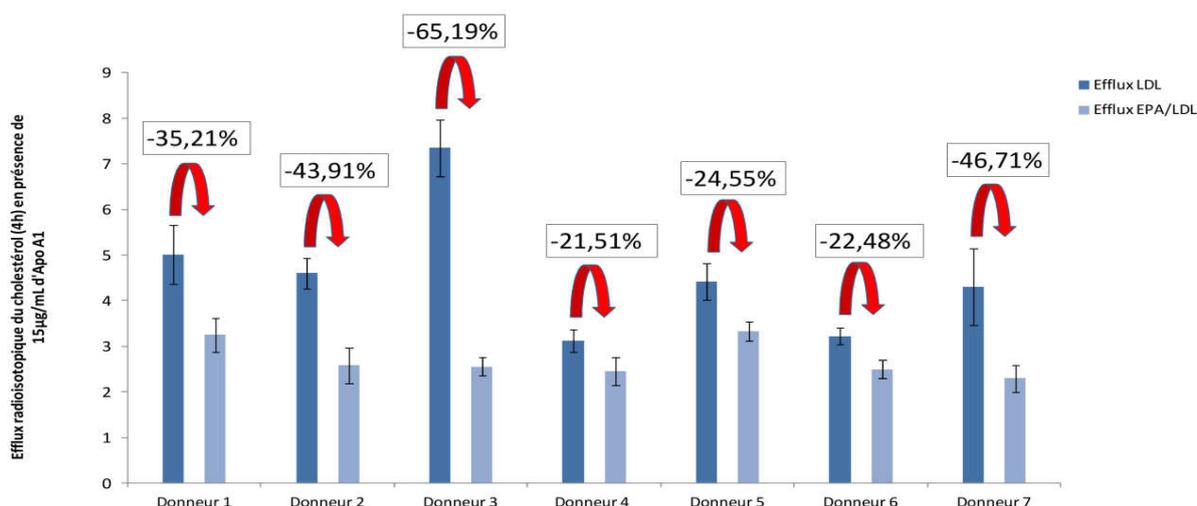


Figure 78 : Niveaux d'efflux du cholestérol entre les macrophages surchargés en cholestérol (LDL) et les macrophages surchargés en cholestérol en présence de  $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$  d'EPA (EPA/LDL)

Ainsi, dans le modèle des HMDM surchargés, l'EPA provoque une diminution de l'efflux du cholestérol comparable à celle observée dans des HMDM au contenu normal en cholestérol. Toutefois, l'analyse détaillée des modifications des lipides membranaires montre que le mécanisme à l'origine de l'altération du fonctionnement de l'ABCA1 est sans doute totalement différent. C'est ce que nous avons ensuite cherché à déterminer et les résultats obtenus font l'objet de la publication présentée ci-après.

Contrairement aux HMDM non surchargés, nous avons observé que d'autres AGPI que l'EPA étaient capables de diminuer l'efflux ABCA1-dépendant. L'EPA exerce l'effet inhibiteur le plus puissant mais le DPA, le DHA ou l'AA et, à un degré moindre, l'acide oléique (AGMI) diminuent aussi l'efficacité de ce transporteur. En revanche, l'acide palmitique comme représentant des AGS ne modifie pas l'efflux du cholestérol. Il n'est donc pas si surprenant que le mécanisme puisse être différent entre les deux modèles. Nous avons ainsi pu constater que la voie de la PKA fonctionnait normalement et qu'il n'y avait pas de modification de l'activité ATPasique de l'ABCA1 qui était le défaut majeur observé dans le modèle des cellules non surchargées<sup>47</sup>. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'anomalie fonctionnelle se situait au niveau de l'hydrolyse des esters de cholestérol des gouttelettes lipidiques. Cette hypothèse était renforcée par l'observation que des HMDM incubés en présence d'EPA et surchargés exclusivement en cholestérol non estérifié (cholestérol « libre », grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de l'ACAT) présentaient un efflux ABCA1-dépendant normal. Nous avons donc mesuré la vitesse d'hydrolyse des esters de cholestérol (EC) dans notre modèle de HMDM surchargés en cholestérol en présence d'EPA et avons démontré que l'EPA était responsable d'une diminution de 24% en moyenne de l'hydrolyse des EC c'est-à-dire sensiblement de la même amplitude que la diminution de l'efflux du cholestérol (-34% en moyenne).

La mobilisation des EC des gouttelettes lipidiques est un phénomène complexe qui n'est pas encore totalement élucidé. Dans les macrophages de Souris, ces gouttelettes lipidiques sont délivrées aux lysosomes par le phénomène d'autophagie. Leurs EC sont alors hydrolysés par la lipase acide et le cholestérol libre ainsi libéré est pris en charge par l'ABCA1 pour être efflué. Cette voie d'hydrolyse n'a jamais été démontrée comme existant réellement dans des HMDM. Nous l'avons toutefois explorée et avons démontré que ce mécanisme n'était pas impliqué puisque, dans notre modèle, le flux autophagique est tout à fait normal. La voie de mobilisation des EC la mieux décrite dans les HMDM implique l'action dans le cytoplasme de plusieurs enzymes dont les deux principales sont la cholestérol hydrolase neutre (nCEH) encore appelée carboxylestérase 1 (CES1) et la cholestérol ester hydrolase 1 ou NCEH1. Ces deux enzymes ont en fait une spécificité de substrats très large et hydrolysent aussi bien les EC que les triglycérides (TG). Il a été décrit dans la littérature l'action inhibitrice d'AGPI (dont l'AA et l'EPA) sur la CES1. On peut donc imaginer que la modification de la composition des EC des gouttelettes lipidiques puisse être à l'origine du défaut de leur mobilisation.

Toutefois, nous observons des compositions en AG des EC très variables selon l'AGPI ajouté avec pourtant toujours une diminution de l'hydrolyse de ces EC associée à une diminution de l'efflux. Il nous semble donc peu probable que la seule modification du profil qualitatif des EC puisse expliquer le défaut de leur mobilisation depuis les gouttelettes lipidiques. Nous avons donc concentré notre attention sur le second composé majeur de ces gouttelettes à savoir les TG qui, en modifiant l'état physique de ces gouttelettes peuvent aussi jouer un rôle dans l'hydrolyse des EC. Ceci nous a permis de montrer qu'il existait une très bonne relation entre l'importance de l'accumulation des TG et l'amplitude des diminutions de l'hydrolyse des EC et de l'efflux du cholestérol libre. Enfin, nous avons voulu savoir si l'impact de l'EPA sur les HMDM surchargés en cholestérol était spécifique de l'efflux médié par l'ABCA1 ou pas. Nous avons ainsi pu observer que l'efflux du cholestérol vers des HDL, impliquant CLA-1 comme récepteur ou l'ABCG1 comme transporteur, était aussi altéré. Ceci renforce le fait que les modifications induites par l'EPA concernent bien la mobilisation des EC des gouttelettes lipidiques.

## Accepted Manuscript

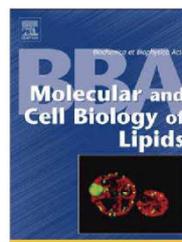
Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages by reducing the cholesteryl ester mobilization from lipid droplets

Natalie Fournier, Guillaume Sayet, Benoît Védie, Maxime Nowak, Fatima Allaoui, Audrey Solgadi, Eric Caudron, Pierre Chaminade, Jean-François Benoist, Jean-Louis Paul

PII: S1388-1981(17)30142-7  
DOI: [doi:10.1016/j.bbaliip.2017.07.011](https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2017.07.011)  
Reference: BBAMCB 58184

To appear in: *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*

Received date: 22 February 2017  
Revised date: 18 July 2017  
Accepted date: 20 July 2017



Please cite this article as: Natalie Fournier, Guillaume Sayet, Benoît Védie, Maxime Nowak, Fatima Allaoui, Audrey Solgadi, Eric Caudron, Pierre Chaminade, Jean-François Benoist, Jean-Louis Paul, Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages by reducing the cholesteryl ester mobilization from lipid droplets, *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* (2017), doi:[10.1016/j.bbaliip.2017.07.011](https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2017.07.011)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages by reducing the cholesteryl ester mobilization from lipid droplets**

**Natalie FOURNIER <sup>a,b,\*</sup>, Guillaume SAYET <sup>c</sup>, Benoît VEDIE <sup>b</sup>, Maxime NOWAK <sup>a</sup>, Fatima ALLAOUI <sup>a</sup>, Audrey SOLGADI <sup>d</sup>, Eric CAUDRON <sup>c</sup>, Pierre CHAMINADE <sup>c</sup>, Jean-François BENOIST <sup>c</sup>, Jean-Louis PAUL <sup>a,b</sup>,**

<sup>a</sup> Univ Paris Sud-Paris Saclay, EA 7357, Lip(Sys) <sup>2</sup>, Athérosclérose: homéostasie et trafic du cholestérol des macrophages (FKA EA 4529), UFR de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France

<sup>b</sup> AP-HP (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), Hôpital Européen Georges Pompidou, Laboratoire de Biochimie, 75015 Paris, France

<sup>c</sup> Univ Paris Sud-Paris Saclay, EA 7357, Lip(Sys) <sup>2</sup>, Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA 4041), UFR de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France

<sup>d</sup> Univ Paris Sud-Paris Saclay, SFR IPSIT (Institut Paris-Saclay d'Innovation Thérapeutique), UMS IPSIT Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites, 92296 Châtenay-Malabry, France

<sup>e</sup> AP-HP (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), Hôpital Robert Debré, Laboratoire de Biochimie hormonale, 75019 Paris, France

\* corresponding author:

Natalie FOURNIER, Laboratoire de Biochimie Appliquée, Lip(Sys) <sup>2</sup>, Athérosclérose: homéostasie et trafic du cholestérol des macrophages (FKA EA 4529), UFR de Pharmacie, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France, Tel: +33 1 46 83 57 23, Fax : +33 1 46 83 56 95, e-mail: [natalie\\_fournier@yahoo.fr](mailto:natalie_fournier@yahoo.fr)

Running title: eicosapentaenoic acid and cholesterol efflux from foam cells

8 Figures and 1 Table

4 Supplemental Figures

Abbreviations: AA, arachidonic acid; ABCA1; ATP binding cassette transporter A1; ACAT, acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase; apo, apolipoprotein; CE, cholesteryl esters; CHD, coronary heart disease; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FA, fatty acids; FC, free cholesterol; HMDM, human monocyte-derived macrophages; LD, lipid droplets; LXR/RXR, liver X receptor/retinoid X receptor; MUFA, monounsaturated fatty acids; PKA, protein kinase A; PL, phospholipids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; SR-BI-Cla-1, scavenger receptor class B type I-CD36 and LIMPII analogous-1; TG, triglycerides

**ABSTRACT**

A diet containing a high n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) ratio has cardioprotective properties. PUFAs incorporation into membranes influences the function of membrane proteins. We investigated the impact of the membrane incorporation of PUFAs, especially eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5 n-3), on the anti-atherogenic cholesterol efflux pathways. We used cholesteryl esters (CE)-loaded human monocyte-derived macrophages (HMDM) to mimic foam cells exposed to the FAs for a long period of time to ensure their incorporation into cellular membranes. Phospholipid fraction of EPA cells exhibited high levels of EPA and its elongation product docosapentaenoic acid (DPA) (C22:5 n-3), which was associated with a decreased level of arachidonic acid (AA) (C20:4 n-6). EPA 70  $\mu$ M reduced ABCA1-mediated cholesterol efflux to apolipoprotein (apo) AI by 30% without any alteration in ABCA1 expression. The other tested PUFAs, DPA, docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6 n-3), and AA, were also able to reduce ABCA1 functionality while the monounsaturated oleic FA slightly decreased efflux and the saturated palmitic FA had no impact. Moreover, EPA also reduced cholesterol efflux to HDL mediated by the Cla-1 and ABCG1 pathways. EPA incorporation did not hinder efflux in free cholesterol-loaded HMDM and did not promote esterification of cholesterol. Conversely, EPA reduced the neutral hydrolysis of cytoplasmic CE by 24%. The reduced CE hydrolysis was likely attributed to the increase in cellular TG contents and/or the decrease in apo E secretion after EPA treatment. In conclusion, EPA membrane incorporation reduces cholesterol efflux in human foam cells by reducing the cholesteryl ester mobilization from lipid droplets.

**Keywords:** EPA; cholesterol efflux; cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages; cholesteryl ester hydrolysis; triglycerides; apo E

## 1. Introduction

Atherosclerosis is the leading cause of heart attacks, stroke, and peripheral vascular diseases, which are the leading cause of morbidity and mortality in most developed countries [1]. The hallmark of the early atherosclerosis lesion is the cholesteryl esters (CE)-laden macrophage, or foam cells [2]. The excess of free cholesterol (FC) derived from the unregulated uptake of modified LDL is esterified by the acyl-coenzyme A: cholesterol acyl transferase (ACAT) and stored as CE in cytoplasmic lipid droplets (LD). Efflux of FC from foam cells to extracellular acceptors is considered a crucial step in the cardioprotective reverse cholesterol transport pathway whereby excess sterol is transported from the arterial wall to the liver for elimination [3]. The ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux to lipid-free and lipid-poor apolipoprotein (apo) AI-containing particles is the most important efflux mechanism [4-6]. However, the SR-BI (scavenger receptor class B type I) / Cla-1 (the human homologue of SR-BI) and to a less extent the ABCG1-mediated cholesterol efflux to phospholipid (PL)-rich HDL also contribute to the removal of excess cholesterol from human foam cells [7]. Since only FC can be effluxed from cells to extracellular acceptors, CE must first be hydrolyzed to FC. The hydrolysis of CE is thus the obligatory first step in CE mobilization from macrophages and is often considered as the rate-limiting step in FC efflux [8]. There are two pathways for CE mobilization from macrophages and the respective importance of each of these pathways depends on the species. The best known process involves cytosolic neutral CE hydrolases (nCEH) [8]. More recently, using murine macrophages, autophagy was reported to mediate the delivery of cytosolic LD to lysosomes where Lysosomal Acid Lipase (LAL) hydrolyzes LD-CE to generate FC for efflux [9].

There is growing evidence that a diet containing a high n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) ratio has cardioprotective properties [10-13]. Importantly, the large-scale Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS) clinical trial reported that long-term use of pure EPA is effective for prevention of cardiovascular events in Japanese hypercholesterolemic patients treated with a statin [14]. However, because some clinical trials reported mixed findings, there is an ongoing debate whether n-3-fatty acids protect from cardiovascular disease mortality [15-18].

ABCA1 is a full membrane transporter highly sensitive to variations in membrane physicochemical characteristics [19,20]. PUFA incorporation into membranes may affect the fluidity, organization and function of membrane proteins. We previously reported in macrophages that decreasing the membrane fluidity by incorporating *trans* elaidic or palmitic acids diminished ABCA1 functionality [21]. We also showed that the membrane incorporation of arachidonic acid (C20:4 n-6, AA) in cardiomyocytes decreased the ABCA1 function, whereas the membrane incorporation of docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, DHA) increased the ABCA1 function [22]. More recently, we reported that eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3, EPA) impaired ABCA1-dependent

cholesterol efflux in mouse macrophages as well as in primary human macrophages with a normal cholesterol content, whereas AA and DHA had no impact [23].

The present study was undertaken to evaluate the impact of the membrane incorporation of PUFAs, especially EPA, on the cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages. The macrophages were exposed to the tested fatty acids for a long period of time to ensure their incorporation into cellular membranes.

Our major finding showed that EPA membrane incorporation reduced ABCA1- and Cla-1 / ABCG1-mediated cholesterol efflux pathways in cholesterol-loaded human macrophages by reducing CE hydrolysis. This probably occurs by increasing cellular triglycerides (TG) and/or decreasing apo E secretion.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of human lipoproteins and lipoprotein deficient serum (LPDS)

LDL and total HDL were isolated from plasma of individual normolipidemic donors (Etablissement Français du Sang, EFS) by sequential ultracentrifugation in the density ranges of 1.09-1.063 g/ml and 1.063-1.21 g/ml, respectively. Lipoprotein deficient serum (LPDS) was obtained by ultracentrifugation of human plasma at a background density of 1.21 g/ml. All the lipoproteins and LPDS were extensively dialyzed against PBS, filtered through a 0.2 µm filter and stored at 4°C. LDL was chemically modified by acetylation (acLDL) with the use of sodium acetate and acetic anhydride [24]. Acetylation was confirmed by demonstrating an increased relative electrophoretic mobility on agarose gels. Native or modified lipoproteins and LPDS were used within three weeks.

### 2.2. Preparation of radiolabeled LDL

As described in detail elsewhere [25], the incorporation of radiolabeled cholesteryl ester into LDL was achieved in the presence of LPDS as a source of core lipid transfer activity as reported by Terpstra et al. [26] with slight modifications.

### 2.3. Uptake of acetylated LDL

After obtention of human monocyte-derived macrophages (HMDM) as described below, cells cultured with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) were supplemented with or without EPA for 32 h (see § 2.7). Thereafter, HMDM were washed with PBS and exposed to human acetylated LDL radiolabeled with [<sup>3</sup>H]-cholesteryl oleate (2 µCi/ml, 75 µg/ml) in the presence or absence of 10% FBS. After 24 hours, the cells were rinsed, cellular lipids were extracted in a mixture of hexane and 2-propanol (3:2, v/v) and the cell proteins were dissolved in 0.2 M NaOH to quantify

protein mass by BCA method. The intracellular radioactivity expressed as cpm/ $\mu$ g protein reflected the cellular uptake of LDL-cholesterol.

#### *2.4. Cell culture of human monocyte-derived macrophages (HMDM) and general experimental design to study the impact of FA*

Human monocytes were obtained from peripheral blood of individual normolipidemic donors (EFS) by centrifugation over a Ficoll gradient and subsequently differentiated into macrophages by adhesion on plastic Primaria® plates over a period of 11 days of culture in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, penicillin-streptomycin and 20 ng/ml human macrophage-colony stimulating factor (hM-CSF) [7,23,27]. All compounds were purchased endotoxin-tested. Most determinations were carried out using 24-well plates except FA analysis, Western blotting analyses and lipid quantifications, which were carried out using 6-well plates. We previously reported that HMDM cultured in these conditions exhibited a majority of classically activated macrophages (M1 phenotype) associated with a minority of alternatively activated macrophages (M2 phenotype) [23]. At day 11, human macrophages cultured with 10% FBS were supplemented with or without FAs for 32 h (see §2.7). Thereafter, HMDM were converted to cholesterol-loaded foam cells by incubation with 75  $\mu$ g/ml of acLDL for 24 h added to the experimental medium supplemented with or without FAs and containing 10% FBS. After a 16 h equilibration period in FBS-free culture medium containing 0.2% BSA with LXR/RXR agonists (5  $\mu$ g/ml 22-hydroxy-cholesterol and 10  $\mu$ M 9-cis-retinoic acid) to induce ABCA1 expression [7], the cholesterol-loaded HMDM were ready for experimentations. Cholesterol efflux, FA profiles, Western blots, apoptosis, lipid masses and apo E secretion were then determined at the same time (otherwise indicated).

#### *2.5. Efflux of labeled cholesterol to apo AI or HDL*

The labeling period was achieved by addition of [ $^3$ H]-cholesterol (1  $\mu$ Ci/well) to the experimental medium supplemented with or without FAs and containing 10% FBS during the 24 h loading period with acLDL. After the equilibration step, ABCA1-overexpressing cholesterol-loaded HMDM were incubated with RPMI alone or 15  $\mu$ g/ml apo AI (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 4 h or 24 h. Each sample was analyzed in triplicate and the fractional cholesterol efflux values were calculated as % of cpm in medium relative to total cpm in medium and cells. The amount of [ $^3$ H]-cholesterol released to the apo AI-free medium (basal efflux) was subtracted from cholesterol efflux to apo AI to yield the apo AI-specific efflux. In these conditions, cholesterol efflux to apo AI proceeds mainly by the ABCA1 pathway. When required, depletion of cellular ATP was achieved by incubation with 15 mM sodium azide in glucose free-RPMI media (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 1 h prior to the efflux period [7,21,23]. After three washes, HMDM were incubated with 15  $\mu$ g/ml apo AI diluted in glucose-free RPMI media to prevent ATP synthesis *via* glycolysis for 4 h. In a few

experiments, we studied the consequences of the pharmacological modulation of the protein kinase A (PKA) pathway on cholesterol efflux. For this purpose, 30  $\mu\text{M}$  forskolin (activator of adenylate cyclase) and 200  $\mu\text{M}$  isobutylmethylxanthine (inhibitor of cAMP phosphodiesterase) were added during the equilibration step and maintained during the efflux phase. In some experiments, 2  $\mu\text{g/ml}$  of an ACAT inhibitor (ACATi) (Sandoz 58035 compound, Sigma) was added during the cholesterol loading period and maintained during the equilibration step and the efflux period. These conditions allowed the obtention of FC-enriched cells. Moreover, in other experiments, ACATi was added only during the 24 h efflux period to prevent FC re-esterification.

For cholesterol efflux to HDL, cholesterol-loaded HMDM were equilibrated in FBS-free culture medium containing 0.2% BSA with LXR/RXR agonists in the presence or absence (no drug) of 10  $\mu\text{M}$  probucol, an inhibitor of ABCA1 protein [28,29]. Thereafter, 4 h and 24 h cholesterol efflux to HDL (15, 50 and 125  $\mu\text{g/ml}$  PL) were measured in the presence or absence of 10  $\mu\text{M}$  probucol. Values were corrected for the amount of [ $^3\text{H}$ ]-cholesterol released to the HDL-free medium. In these conditions, cholesterol efflux measured with probucol involves mainly the Cla-1 and ABCG1 pathways, while cholesterol efflux measured without probucol involves Cla-1 / ABCG1 and ABCA1 pathways.

#### 2.6. Mass cholesterol efflux assays

We addressed in Std cells the role of autophagy versus neutral cholesterol esterase in cholesterol efflux. For this purpose, 30  $\mu\text{M}$  chloroquine, 100  $\mu\text{M}$  paraoxon or 30  $\mu\text{M}$  vinblastine were added during the efflux period with an ACAT inhibitor. Chloroquine and paraoxon were used as aCEH or nCEH inhibitor, respectively, while vinblastine was used as inhibitor of the fusion between autophagosomes and lysosomes. After 24 h of incubation with RPMI alone or 15  $\mu\text{g/ml}$  apo AI, the media were removed and the cells lysed in 0.2 M NaOH. Cell and media samples were extracted and analyzed for FC and CE masses by HPLC (see § 2.12). Each sample was analyzed in triplicate and mass cholesterol efflux was expressed as the percentage of efflux (medium cholesterol over total cholesterol-medium and cells). The amount of FC released to the apo AI-free medium (basal efflux) was subtracted from cholesterol efflux to apo AI to yield the apo AI-specific efflux.

#### 2.7. Membrane fatty acid (FA) alterations

To investigate the effect of membrane FA enrichment, the human macrophages at day 11 were incubated 32 h with experimental media enriched with either 70  $\mu\text{M}$  EPA, 50  $\mu\text{M}$  AA, 15  $\mu\text{M}$  DHA, 15  $\mu\text{M}$  docosapentaenoic acid (DPA), 70  $\mu\text{M}$  oleic acid or 70  $\mu\text{M}$  palmitic acid (Cayman, Chemical Company, Ann Harbor, MI) prepared by adding FAs to serum albumin in the standard culture medium (10% FBS) as previously described [22,30] (final molar ratio of FA/albumin was near 2). In a limited number of experiments, higher concentrations of FAs were tested. None of these

concentrations was toxic to the human macrophages as determined microscopically, by the cellular content and by the measurement of LDH released into the medium. Some cells were left untreated in standard medium (Std cells, standard cells). The FAs were maintained or not (Std cells) during the 24 h subsequent loading period with acetylated LDL.

#### 2.8. Fatty acids analysis

The cholesterol-loaded HMDM were harvested in distilled water and lipids were extracted in 2:1 chloroform-methanol mixture. Phospholipids (PL) were separated from neutral lipids on aminopropyl columns according to the method developed by Pinkart et al. [31] and the FAs were trans-methylated with methanol-acetyl chloride. The FA methyl esters (FAME) were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) on a TRACE GC ultra coupled to an ion trap mass spectrometer detector ITQ 900 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) on a Trace GOLD-TG polar column (30 m x 0.25 mm, Thermo Fisher Scientific). A mixture was used to identify FAME in samples, and the results were expressed as the relative abundance of total FA using nonadecanoic acid (C19:0) as an internal standard.

#### 2.9. Western blotting analysis for ABCA1

As previously described [21,23,32], the cholesterol-loaded HMDM were lysed on ice and the total cell lysate (30  $\mu$ g) was electrophoresed under reducing conditions on 3-8% NuPAGE Tris acetate gels (Novex, Carlsbad, CA). The results were expressed as the ratio of ABCA1 to  $\beta$ -actin (loading control) using Adobe Photoshop 7.0 software (Adobe, San Jose, CA).

#### 2.10. Quantification of apoptosis

##### DNA fragmentation

Apoptotic cell death was quantified using cell cycle analysis by cytometric quantification of DNA content using a fluorescence-activated cell sorter (FACS) as previously described [23,33]. The human macrophages (in standard cell culture medium or after EPA supplementation) were treated or not with 1  $\mu$ M staurosporine (Sigma-Aldrich) for 24 h to induce apoptosis. Analysis of DNA fragmentation using propidium iodide was performed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

##### Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )

The inner mitochondrial membrane is characterized by a transmembrane potential  $\Delta\Psi_m$  generated through the activity of a proton pump in the respiratory chain. Human macrophages (in standard cell culture medium or after EPA supplementation) were treated or not with 1  $\mu$ M staurosporine for 16 h and then loaded with a Mitotracker fluorochrome (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide, DiOC6) (Life

Technologies, St Aubin, France) [23,33]. Analysis of relative fluorescence intensities was performed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

#### 2.11. Oil Red O staining

The cholesterol-loaded HMDM were fixed with 3% (v/v) paraformaldehyde for 5 min and washed twice with PBS. The cells were then stained with 0.3% Oil Red O solution for 15 min followed by staining of the nuclei with Mayer's hematoxylin. Oil red O is a dye soluble in lipids that stains neutral lipids such as triglycerides and cholesteryl esters. Lipid droplets contained in foam cells were observed under a microscope at X 200 magnification.

#### 2.12. Determination of free and esterified cholesterol masses

The cholesterol-loaded HMDM were lysed by addition of 0.2 M NaOH. As previously described, a sample was removed for protein determination using the BCA method, while the remaining cell lysate was used to quantify FC and CE contents using HPLC [22]. This method allows the determination of seven cholesteryl esters: linoleate, oleate, arachidonate, docosahexaenoate, palmitate, myristate and stearate. If present, cholesteryl eicosapentaenoate and cholesteryl docosapentaenoate comigrate with cholesteryl docosahexaenoate as a unique cholesteryl- $\omega$ 3 peak. The results were expressed as nmol cholesterol/mg cell protein.

#### 2.13. Plasma membrane cholesterol content assay

The cholesterol content in the outer layer of the plasma membrane was assessed by measuring specific oxidation with exogenous cholesterol oxidase from *Nocardia erythropolis* (Sigma-Aldrich) [34]. The human macrophages supplemented with or without EPA were cholesterol-loaded by incubation with [ $^3$ H]-cholesterol-acetylated LDL and equilibrated as for efflux. Cells were then incubated for 2 h at 37°C in PBS without or with cholesterol oxidase (1 UI/ml). Cellular lipids were extracted in a mixture of hexane and 2-propanol (3:2, v/v) and dried under nitrogen. As previously described [23], the samples were then subjected to thin-layer chromatography. Spots corresponding to FC and 4-cholestanone were scraped, and radioactivity was measured using liquid scintillation counting. The amount of FC oxidized in the plasma membrane into cholestanone was expressed as a percent of total cell cholesterol.

#### 2.14. Measurement of cellular phospholipid and triglyceride contents

The lipids from cholesterol-loaded HMDM were extracted in a mixture of hexane and 2-propanol (3:2, v/v) and dried under nitrogen. The PL and TG contents were determined enzymatically using kits from DiaSys (DiaSys, Holzheim, Germany) and Biomerieux (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), respectively, and expressed as nmol/mg protein determined using the BCA method. In

addition, the PL classes were determined by liquid chromatography using a Corona CAD detection as previously described [35].

#### 2.15. Measurement of CE hydrolysis

The cholesterol-loaded HMDM supplemented with or without FAs underwent the equilibration step as described for efflux. A set of plates were harvested to determine the initial FC and CE masses as described above. The remaining monolayers were incubated in RPMI 1640 medium containing 2 µg/ml of Sandoz 58035 ACAT inhibitor for 24 h [36]. Hydrolysis of esterified cholesterol (nmol/mg protein) was assessed by measuring the difference in cellular CE content between the beginning and the end of the period during which the cells were exposed to the ACATi. This protocol allowed the assessment of hydrolase activity because re-esterification by ACAT of free cholesterol generated by the hydrolysis of cholesteryl esters was prevented [37].

#### 2.16 Measurement of apo E secretion into medium

The supernatant from cholesterol-loaded HMDM was collected, centrifuged at 4°C to remove cell debris and analyzed for apo E secretion by a sandwich enzyme immunoassay kit according to manufacturer's protocol (R and D Systems Europe Ltd, Lille, France).

#### 2.17. Statistical analyses

The data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The values corresponded to the mean from at least three independent experiments. Comparisons of two groups were performed by an unpaired Student's t-test using StatView 5.0 software (SAS Institute, Berkeley, CA). Significance was assessed at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Incorporation of PUFAs reduced the ABCA1-mediated cholesterol efflux from cholesterol-loaded HMDM

We first evaluated the impact of several FA membrane incorporation on the ABCA1-mediated cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages. For these screening experiments, we conducted a limited number of preparations using cells incubated 4 h with lipid-free apo AI as acceptor. As illustrated in **Fig. 1**, EPA 70 µM reduced efflux by 29% on average. However, the other tested PUFAs were also able to reduce the ABCA1-mediated cholesterol efflux (-25% for DPA 15 µM, -24% for DHA 15 µM and -17% for AA 50 µM, respectively, on average). Importantly, the monounsaturated oleic FA 70 µM slightly decreased cholesterol efflux (-15% on average), whereas the saturated palmitic FA 70 µM had no impact.

### *3.2. Incorporation of EPA reduced the ABCA1-mediated cholesterol efflux from cholesterol-loaded HMDM*

Because EPA reduced cholesterol efflux not only from unloaded human macrophages [23] but also from cholesterol-loaded HMDM, we focused our attention especially on this fatty acid by achieving a large number of cholesterol efflux experiments in two experimental conditions. As shown in **Fig. 2**, EPA membrane incorporation reduced the ABCA1-mediated cholesterol efflux after 4 h of incubation (-30% on average) and also after 24 h of incubation (-34% on average), exhibiting an effect that persisted over an extended period.

### *3.3. Incorporation of EPA reduced the cholesterol efflux to HDL from cholesterol-loaded HMDM*

In the 24 h cholesterol efflux experiments using lipid-free apo AI as an acceptor, apo AI likely becomes sufficiently lipidated to stimulate other mechanisms of efflux than ABCA1. The SR-BI/Cla-1 protein is a key component in the elimination of FC from cholesterol-loaded human macrophages, while the contribution of ABCG1 appears to be less important [7]. We investigated the impact of EPA on cholesterol efflux to HDL with or without probucol, an inhibitor of ABCA1 protein [28,29]. In our experimental conditions, probucol inhibited efflux to apo AI by 85% to 90%. (data not shown). Using increasing amounts of HDL for a 4-hour or 24-hour chase period, probucol moderately inhibited cholesterol efflux (33% of inhibition for 50 µg/ml HDL-PL after 24 h) (**Fig. 3**). Importantly, in absence or in presence of probucol, EPA 70 µM reduced cholesterol efflux to HDL by 26% and 30% (50 µg/ml HDL-PL) after 4 h and 24 h, respectively. Altogether, our results suggested that EPA membrane incorporation reduced the ABCA1- and the Cla-1-/ ABCG1 mediated cholesterol efflux pathways.

### *3.4 ABCA1 expression levels did not account for the ABCA1-mediated cholesterol efflux reductions from EPA-treated cholesterol-loaded HMDM*

In our efforts to elucidate the mechanism(s) by which EPA reduced cholesterol efflux to apo AI, we first excluded the hypothesis that FA treatment had significantly modulated the ABCA1 expression at the beginning of the efflux chase. The ABCA1 protein levels measured after the loading period were unchanged with EPA membrane enrichment (**Supplemental Fig. 1**). The subsequent equilibration step with LXR/RXR agonists induced an increase in ABCA1 protein. Importantly, this augmentation was of the same magnitude for the Std cells or the EPA-treated cells, leading thus to similar ABCA1 expressions when the efflux period was initialized. These results suggested that the reduction in ABCA1-mediated cholesterol efflux after EPA treatment was not caused by variations in ABCA1 transporter expression.

### 3.5. Cellular incorporation of EPA affected the membrane fatty acids composition in cholesterol-loaded HMDM

We then determined the consequences of 70  $\mu\text{M}$  EPA supplementation on the FA composition. As shown in **Table 1**, cholesterol-loaded HMDM incorporated EPA and its elongation product DPA (C22:5 n-3), which reached 13% and 5.5% of the total FA, respectively. We also noted that EPA cells displayed a  $\sim 2.4$ -fold decreased AA content compared to Std cells. The proportion of monounsaturated fatty acids (MUFAs) was reduced, whereas the proportion of saturated fatty acids (SFAs) was slightly increased after EPA supplementation. As a result, EPA-enriched cholesterol-loaded HMDM exhibited an unsaturation index similar to Std cells.

### 3.6. Incorporation of EPA did not induce apoptosis in cholesterol-loaded HMDM

As it was reported that PUFAs may cause cellular damages [38,39], we investigated the apoptosis state by two complementary methods. As shown in **Supplemental Fig. II**, staurosporine induced a significant decrease in fluorescence reflecting the  $\Delta\Psi_{\text{m}}$  variation (A) (early stage of apoptosis) and a significant increase in the sub-G1 phase cell population (B) (late stage of apoptosis). Importantly, EPA treatment induced a slight and not significant loss of mitochondrial potential. Moreover, EPA treatment had no impact on the cells undergoing DNA fragmentation. Thus, there was no significant apoptosis caused by the 70  $\mu\text{M}$  EPA supplementation.

### 3.7. Incorporation of EPA had no impact on cellular FC content or on the FC:PL molar ratio in cholesterol-loaded HMDM

We then wondered whether the total incubation time of  $\sim 56$  h with 70  $\mu\text{M}$  EPA altered the FC content or the cellular FC:PL molar ratio, which is an important factor in determining the availability of the FC for cholesterol efflux. In three independent experiments, EPA induced a slight and not significant increase in FC levels and a slight and not significant decrease in PL levels (FC:  $125.4 \pm 23.7$  nmol/mg vs  $116.2 \pm 21.3$  nmol/mg; PL:  $121.4 \pm 14.5$  nmol/mg vs  $126.3 \pm 12.5$  nmol/mg for EPA cells and Std cells, respectively). As a result, EPA induced a slight and not significant increase in FC:PL ratio ( $1.03 \pm 0.16$  vs  $0.92 \pm 0.14$  for EPA cells and Std cells, respectively). In addition, there was no significant difference in the composition of PL classes between EPA cells and Std cells; phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyelin, lysophosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol and lysophosphatidylethanolamine represented on average 40%, 19%, 16%, 12%, 6%, 4% and 3% of total PL, respectively. Our results suggested that the reduction of cholesterol efflux caused by EPA incorporation was not attributed to lower cellular FC content or to a modification of the relative proportions of FC and PL classes into plasma membrane.

*3.8. Incorporation of EPA did not reduce the cholesterol content in the outer layer of the plasma membrane in cholesterol-loaded HMDM*

We next investigated if EPA affected the cholesterol distribution within the plasma membrane by performing a cholesterol oxidase accessibility test. The amount of specifically oxidized [<sup>3</sup>H]-cholesterol was 40% higher for EPA cells than for Std cells ( $8.5 \pm 1.9\%$  vs  $6.1 \pm 1.2\%$  for EPA and Std cells, respectively). Our results showed that EPA membrane incorporation did not reduce the redistribution of FC to the outer layer of the plasma membrane.

*3.9. Cellular ATP was not required for the effect of EPA on ABCA1-mediated cholesterol efflux in cholesterol-loaded HMDM*

We also questioned whether the impact of EPA on the ABCA1-mediated cholesterol efflux was energy dependent by depleting human macrophages of ATP and measuring cholesterol efflux. As shown in **Supplemental Fig. III**, the decrease in the ABCA1-mediated cholesterol efflux caused by the decrease in intracellular ATP was of the same magnitude for the cholesterol-loaded macrophages grown in standard medium and for the EPA-enriched cholesterol-loaded macrophages (-35% and -41% for EPA cells and Std cells, respectively). As a result, cholesterol efflux from EPA-treated cells was 34% lower than standard cells in basal conditions and 30% lower than standard cells when cells were depleted in ATP. Our results suggested that EPA membrane incorporation did not reduce the ABCA1-mediated cholesterol efflux by reducing the ATPase activity of the transporter.

*3.10. PKA was not involved in the impairment of ABCA1-mediated cholesterol efflux from EPA enriched cholesterol-loaded HMDM*

EPA impaired PKA activity from unloaded or cholesterol-loaded human macrophages [23,40]. We thus studied the impact of the modulation of the PKA pathway on the ABCA1-mediated cholesterol efflux from three preparations of cholesterol-loaded HMDM. The combination of forskolin with isobutylmethylxanthine induced a very small and not significant increase in cholesterol efflux from both standard cells and EPA-enriched cells ( $4.41 \pm 1.14\%$  vs  $4.24 \pm 0.86\%$  and  $2.82 \pm 0.45\%$  vs  $2.66 \pm 0.61\%$  for Std cells and EPA cells, respectively). Our results suggested that EPA decreased ABCA1-mediated cholesterol efflux *via* a PKA-independent mechanism.

*3.11. Incorporation of EPA increased cellular TG and CE contents in cholesterol-loaded HMDM*

The Oil Red O staining experiments revealed that EPA supplementation increased number and size of lipid droplets in macrophages (data not shown). We thus compared in eight preparations the cellular neutral lipid contents between EPA-enriched cells and Std cells. The EPA 70  $\mu\text{M}$  supplementation induced an increase in CE masses of 56% on average ( $191.7 \pm 19.0\text{ nmol/mg}$  vs  $122.7 \pm 17.1\text{ nmol/mg}$  for EPA cells and Std cells, respectively) and in the proportion of the

esterified cholesterol ( $54.4 \pm 4.0\%$  vs  $42.5 \pm 3.1\%$  for EPA cells and Std cells, respectively). The FC masses remained similar between EPA cells and Std cells ( $170.4 \pm 27.5$  nmol/mg vs  $173.3 \pm 27.8$  nmol/mg for EPA cells and Std cells, respectively) and the EPA supplementation induced an increase in TC masses of 23% ( $362.1 \pm 39.2$  nmol/mg vs  $295.3 \pm 41.4$  nmol/mg for EPA cells and Std cells, respectively). Overall, the most dramatic impact of EPA supplementation on neutral lipids was the important increase in cellular TG masses ( $131.0 \pm 20.9$   $\mu$ g/mg vs  $55.5 \pm 10.5$   $\mu$ g/mg for EPA cells and Std cells, respectively). Importantly, the incorporation of DPA, DHA or AA led to increases in TG contents of the same magnitudes (data not shown); the impact of oleic acid was moderate (+20% on average), whereas palmitic acid had no impact on TG levels.

### *3.12. Incorporation of EPA induced strong modifications in CE subspecies in cholesterol-loaded HMDM*

We also noted qualitative differences in the CE subspecies between EPA cells and Std cells. The EPA cells contained much higher proportions of n-3 (48% vs 10%) and higher proportions of arachidonate (28% vs 21%), whereas they contained less oleate (9% vs 37%) and less linoleate (13% vs 31%) as the FA esterifying cholesterol. A similar pattern was observed after DPA or DHA supplementation. Cells supplemented with AA displayed much higher proportions of arachidonate than Std cells (50% vs 21%), while cells supplemented with oleic acid displayed much higher proportions of oleate than Std cells (61% vs 37%). The supplementation of palmitate had no impact on the CE subspecies profile.

### *3.13 Incorporation of EPA did not increase the uptake of acLDL in cholesterol-loaded HMDM*

The higher CE masses in EPA cells might be attributable to an enhanced uptake of acetylated LDL during the 24 h loading phase. To test this hypothesis, we investigated in three preparations whether EPA modulates modified LDL uptake by human macrophages. We found similar levels of acLDL uptake by Std cells and EPA cells ( $496 \pm 34$  cpm/ $\mu$ g protein vs  $474 \pm 36$  cpm/ $\mu$ g protein in absence of FBS;  $347 \pm 21$  cpm/ $\mu$ g protein vs  $375 \pm 29$  cpm/ $\mu$ g protein in presence of 10% FBS for Std cells and EPA cells, respectively). Thus, we ruled out acLDL uptake as the mechanism responsible for the increased CE content in EPA cells.

### *3.14 Incorporation of EPA did not reduce the lysosomal hydrolysis of acLDL in cholesterol-loaded HMDM*

The higher CE masses in EPA cells might also be attributable to an altered lysosomal hydrolysis of endocytosed CE in acetylated LDL. To test this hypothesis, we measured in the presence of an ACAT inhibitor the CE masses remaining in HMDM after acLDL loading (75  $\mu$ g/ml) for 24 h followed by a 16 h equilibration step in BSA-serum-free medium (three experiments). Both EPA

cells and standard cells exhibited <1.5% of their total cholesterol in CE (not significant vs each other). These results showed that lysosomal hydrolysis of acLDL-derived CE was total and similar in EPA-treated cells and cells grown in standard medium.

*3.15. Incorporation of EPA did not hinder efflux of unesterified cholesterol to apo AI in cholesterol-loaded HMDM*

In our attempts to elucidate the mechanism(s) by which EPA reduced the efflux of FC in CE-enriched human macrophages, we then performed isotopic efflux experiments in the presence of ACATi added during loading period (24 h), as well as during the equilibration step (16 h) and efflux to apo AI (4 h or 24 h). Under these conditions, cholesterol esterification in the endoplasmic reticulum for storage in lipid droplets was inhibited, and essentially all of the lipoprotein-derived [<sup>3</sup>H]-cholesterol remained unesterified. As expected, the ACATi increased the cholesterol efflux to apo AI from both Std cells and EPA cells (**Fig. 4A and 4B**). However, these increases were much higher for EPA cells than for Std cells (97% vs 60% after 4 h of efflux and 77% vs 44% after 24 h of efflux for EPA cells and Std cells, respectively). As a result, ABCA1-mediated cholesterol from EPA-treated cells was ~23% lower compared to that from standard cells in basal conditions but not significantly different when cells were FC-loaded. Our results suggested that EPA membrane incorporation did not reduce the ABCA1-mediated cholesterol efflux in FC-loaded HMDM.

*3.16. Incorporation of EPA did not promote the esterification of cholesterol in cholesterol-loaded HMDM*

The cytosolic CE contents result from the balance between the CE formation through ACAT activity and the CE hydrolysis through several enzymes. We first ruled out that EPA may alter the CE turnover by stimulating the ACAT during the efflux phase, reducing thus the availability of FC for efflux. We performed cholesterol efflux experiments in which the ACAT inhibitor was added only during the 24 h incubation with free apo AI as an acceptor. As illustrated in **Fig. 5**, ACAT inhibitor-treated cells exhibited higher cholesterol efflux values but the increase was of the same magnitude for Std cells and EPA-treated cells. As a result, the decrease in cholesterol efflux caused by EPA was similar in both experimental conditions. Our results suggested that the impact of EPA on cholesterol efflux to apo AI was largely independent of cholesterol esterification.

*3.17. Incorporation of EPA reduced the hydrolysis of CE in cholesterol-loaded HMDM*

We finally hypothesized that the impact of EPA was attributable to an impaired mobilization of cholesterol from the CE pools, reducing thus the availability of FC for efflux. We thus assessed the CE hydrolysis rates from the lipid droplets by measuring the cellular CE levels after acLDL loading (0- hour chase) or 24 hours after chasing with RPMI 1640 medium in the presence of an ACATi to

prevent the FC re-esterification. Since we combined the data from six independent preparations, the cholesterol loaded HMDM displayed widely differing CE masses (ranges: 40.8 to 167.7 nmol/mg and 110.7 to 247.8 nmol/mg for Std and EPA cells, respectively) (**Fig. 6A**). For Std cells,  $53.0 \pm 3.2\%$  (range 43.9 to 60.6%) of CE was hydrolyzed over 24 h, regardless of the size of the CE pool (**Fig. 6B**). For EPA cells,  $40.3 \pm 3.3\%$  (range 27.7 to 48.7%) of CE was cleared during the same period. Thus, the EPA membrane incorporation reduced the CE hydrolysis by 24%. Moreover, similar data were obtained after chasing with lipid-free apo AI in the presence of an ACATi (hydrolysis rates:  $58.4 \pm 6.9\%$  and  $44.0 \pm 3.2\%$  vs for Std and EPA cells, respectively). Our results confirmed that EPA membrane incorporation reduced the LD-stored CE hydrolysis in cholesterol-loaded HMDM.

### *3.18. Autophagy was not required for ABCA1-mediated cholesterol efflux from cholesterol-loaded HMDM*

Autophagy regulates the CE mobilization and the subsequent FC efflux in mouse macrophages [9]. We addressed the role of autophagy in Std cells by using drugs added during the 24 h efflux period to apo AI in the presence of an ACAT inhibitor. As shown in **Supplemental Fig. IV**, the addition of vinblastine did not alter FC efflux from these cells. Moreover, the inhibition of aCEH by chloroquine led to a slight and not significant decrease in cholesterol efflux (-10%), whereas the inhibition of nCEH by paraoxon led to a dramatic decrease in cholesterol efflux (-65%). Our results suggested that autophagy was not involved in ABCA1-mediated cholesterol efflux from cholesterol-loaded HMDM.

### *3.19. The decreased CE hydrolysis was related to the increased cellular TG contents*

We sought to better investigate the mechanism(s) by which EPA reduced CE hydrolysis. Compared to Std cells, cholesterol-loaded HMDM treated with EPA exhibited much higher TG contents but also higher CE contents, both being able to modulate the hydrolysis efficiency. We pooled experimental data obtained with supplementations of different FAs to better investigate the potential relationships between neutral lipids, CE hydrolysis and cholesterol efflux. The magnitude of TG accumulation was closely positively associated with the magnitude of the decrease in CE hydrolysis (**Fig. 7A**), whereas the magnitude of CE accumulation had no significant impact (**Fig. 7B**). Since the magnitude of the decrease in CE hydrolysis was a good predictor of the magnitude of the decrease in cholesterol efflux (**Fig. 7C**), the magnitude of TG accumulation was positively associated with the magnitude of the decrease in cholesterol efflux (**Fig. 7D**). Conversely, there was no relationship between the magnitude of CE accumulation and the magnitude of the decrease in cholesterol efflux (**Fig. 7E**). Altogether, our results suggested that the decreased cholesterol efflux caused by the decreased CE hydrolysis was mainly attributed to the increase in cellular TG contents after EPA (or other FAs) treatment.

### 3.20. The decreased CE hydrolysis was related to the decreased apo E secretion

Apo E secretion may contribute to cholesterol efflux by modulating the CE hydrolysis efficiency in cholesterol-loaded mouse or human macrophages [41,42]. We measured the apo E secretion into the cell culture medium just before the beginning of efflux period, i.e. after the 16 h equilibration step in BSA with LXR/RXR agonists. We observed in three independent experiments that EPA-enriched HMDM exhibited a 78% decrease in apo E secretion compared with cells grown in standard medium (apo E secretion:  $104 \pm 17$  ng/ml vs  $474 \pm 51$  ng/ml for EPA cells and Std cells, respectively). We then questioned if the level of apo E secreted by cholesterol-loaded HMDM influences the efficiency of CE hydrolysis. Using an approach similar to the one above, we pooled data obtained with Std cells and cells supplemented with either 70  $\mu$ M EPA, 50  $\mu$ M AA or 70  $\mu$ M oleic acid to get a wide range of measured parameters. As shown in **Fig. 8A**, there was a positive association between apo E secretion and CE hydrolysis rates. Moreover, the apo E secretion was positively associated with the 24 h cholesterol efflux values (**Fig. 8B**). Our results suggested that the decreased cholesterol efflux caused by the decreased CE hydrolysis was also attributed to the decrease in apo E secretion after EPA (or other FAs) treatment.

## 4. Discussion

These last decades, the body of evidence supporting a role for n-3 PUFAs in the prevention of coronary heart disease (CHD) has continued to increase [10-14]. However, these beneficial effects are not consistently observed in all epidemiological studies. Actually, these last years, conflicting data were collected with studies showing a weak benefit or no benefit [15-18]. In addition, precise molecular mechanisms underlying the cardioprotective effects of PUFAs are not completely elucidated. A large number of studies are focused on the effects of PUFAs on inflammation [43,44]. Besides this important mechanism through which PUFAs modulate the risk of CHD, we aimed to document the impact of their membrane incorporation on the ability of macrophages to egress free cholesterol, a key anti-atherogenic pathway allowing the removal of excess cholesterol from the arterial wall. Recently, it was reported that the cholesterol efflux capacity is inversely associated with the incidence of cardiovascular events in dyslipidemic subjects as well as in normolipidemic subjects [45-47]. We concentrated our efforts on the efflux mediated by the ABCA1 transporter, which plays the major role in the maintenance of normal cholesterol in tissues [48].

We previously reported that EPA impaired the ABCA1-mediated cholesterol efflux from cholesterol-normal mouse (J774) or primary human macrophages (HMDM) [23]. In HMDM, AA and DHA had no impact on cholesterol efflux, whereas EPA reduced ABCA1 functionality *via*

protein kinase A signaling pathway. This effect was observed with cells exposed to FAs for a long period of time prior the cholesterol efflux assay to adopt a more nutritional approach than pharmacological [21,23]. In the continuity of this study, we further explored the impact of EPA membrane incorporation on cholesterol efflux using cholesterol-loaded HMDM, which is a good physiologically relevant model to mimic foam cells within the human arterial plaque.

As for unloaded HMDM, EPA reduced FC efflux to apo AI without any alteration in ABCA1 transporter expression. However, in contrast with cholesterol-normal human macrophages, some other FAs were also able to reduce cholesterol efflux. EPA was the more potent to exert this effect, but the other tested PUFAs (DPA, DHA and AA) and to a less extent oleic MUFA also diminished the ABCA1 efficiency. Conversely, palmitic SFA had no impact on this biological property.

We thus were not surprised to observe that the mechanism involved in the ABCA1-mediated cholesterol efflux decrease from cholesterol-loaded HMDM was different from the mechanism we previously reported in cholesterol-normal cells. We excluded a defect in the PKA pathway, which could lead to an alteration of the ATPase activity of ABCA1. We then reported that the cholesterol efflux reduction was not attributed to lower cellular FC contents or to a modification of the relative proportions of FC and PL into plasma membrane, which is an important factor to determine the availability of the FC for efflux. The fine membrane phospholipid composition, especially the sphingomyelin content, may also affect the efflux pathway [49,50]. Importantly, we did not observe any significant difference between EPA-treated cells and Std cells in the profile of PL subclasses. We further excluded the possibility that EPA reduced the redistribution of FC to the outer layer of the plasma membrane, where it may be more available for ABCA1-mediated efflux. The cholesterol oxidase data rather suggested an increased FC content as it was previously reported for linoleate and linolenate polyunsaturated FA on fibroblasts [51].

After confirming that the lysosomal hydrolysis of acetylated LDL-derived cholesterol ester was total for EPA-treated cells and Std cells, we assured that the decrease in efflux was attributed to a defective hydrolysis of cholesteryl ester stored in the cytoplasmic lipid droplets characteristic of foam cells. Indeed, when HMDM were FC-loaded, the EPA supplementation did not reduce the ABCA1-mediated cholesterol efflux. We excluded the possibility that EPA altered the CE turnover by stimulating the ACAT activity as it was reported for oleic, arachidonic and eicosapentaenoic acids in cultured cells [52]. Thereafter, we assessed the CE hydrolysis rates in six independent preparations displaying a large range of initial CE contents. We demonstrated that EPA reduced the proportion of CE cleared over 24 h (~24% on average) and that this reduction was of the same magnitude than the decrease in cholesterol efflux (~34% on average).

We explored the molecular mechanism(s) involved in the cellular CE hydrolysis reduction caused by EPA supplementation. In mouse macrophages, LDs could be delivered to lysosomes *via* autophagy, where the acid lipase hydrolyzes CE to generate FC for efflux [9]. However, we have

strong evidence suggesting that autophagy is not involved to provide FC for efflux in cholesterol-loaded human macrophages. Indeed, in contrast with mouse macrophages, cholesterol loading of HMDM induces a decrease in autophagic flux (data not shown). Moreover, the inhibition of aCEH had no impact on CE hydrolysis, whereas the inhibition of nCEH markedly decreased CE hydrolysis (data not shown). Overall, as we reported in this study, the inhibition of aCEH had no significant impact on FC efflux, whereas the inhibition of nCEH strongly decreased FC efflux. In human macrophages, the hydrolysis of LD-associated CE is a multi-enzyme process mainly mediated by the neutral cholesteryl ester hydrolase (nCEH) also called carboxylesterase 1 (CES1) and by the neutral cholesterol ester hydrolase 1 (NCEH1) [8,53-55]. Both enzymes have broad endogenous substrate specificity, including cholesteryl ester and triacylglycerol. The inhibition of CES1 activity in THP-1 macrophages by unsaturated FAs was reported, palmitic saturated FA having no impact [56]. Arachidonic acid was described as the most potent FA to inhibit the hydrolytic activity of THP-1 cell lysate and recombinant CES1 with inhibitory concentration values in the micromolar range. Compared with Std cells, EPA cells displayed ~1.6 fold higher CE and ~2.4 fold higher TG contents. We could have thought that the increase in cellular CE reduced the enzyme efficiency. However, all experiments in which neutral lipids, CE hydrolysis rates and cholesterol efflux were determined regardless the FA added in the experimental medium showed no impact of the increase of cellular CE contents neither on the magnitude of CE hydrolysis decrease nor on the magnitude of cholesterol efflux decrease. We then carefully examined the qualitative profile of cellular CE, which could modulate the enzymatic activity by affecting the physical state of CE [57-59]. Compared with Std cells, cholesterol-loaded HMDM treated with EPA displayed much higher proportions of n-3 and less oleate as the FA esterifying cholesterol. Lada et al. reported that THP-1 human macrophages enriched in CE containing PUFAs displayed higher rates of both CE hydrolysis and cholesterol efflux than cells enriched in CE containing monounsaturated oleic acid [60]. Moreover, we observed that cells supplemented with AA or oleic acid displayed totally different CE subspecies, which were also associated with reduced CE hydrolysis and FC efflux. At this point, it appeared to us that the only modifications of qualitative profile of CE could not by themselves explain the decrease in the hydrolysis of CE. We thus focused our attention on the second component of lipid droplets, i.e. triglycerides, which may also modulate the physical state of the LD and consequently the CE hydrolysis. It was reported in Fu5AH rat hepatoma and in THP-1 human macrophages that high TG contents were associated with isotropic inclusions and to high CE hydrolysis rates [57,58,61]. According to the major TG accumulation observed in EPA-treated HMDM, these data are not in agreement with our results. However, Avart et al. reported opposite results using mouse J774 macrophages in which higher TG contents were also associated with isotropic inclusions [37]. Regardless of cholesteryl ester load, the rate of hydrolysis of CE in cells with isotropic lipid droplets was lower than in cells with anisotropic droplets. The authors gave as potential explanation for the

apparently slower rate of hydrolysis in cells with isotropic lipid inclusions the presence of TG as a competitive substrate in the lipid droplets. We believe that the important TG accumulation in EPA-treated HMDM may be one of the mechanisms involved in the decreased CE hydrolysis. This hypothesis is reinforced by the good relationship between the magnitude of the increase in cellular TG contents and the magnitude of the decreases in CE hydrolysis and in cholesterol efflux. To confirm the potential inhibitory role of TG on CE hydrolysis, we tried to deplete cellular TG from CE-cholesterol loaded HMDM before measuring cholesterol efflux. After 24 h of incubation with triacsin combined to BSA as used by Lada et al. for THP-1 [62], we were unfortunately unsuccessful because these conditions induced an important decrease in TG (42%) but also an important decrease in CE masses (47%). This could be explained by the difference in  $t_{1/2}$  for hydrolysis of CE between THP-1 and HMDM (~61 h in THP-1 and ~24 h in our model of HMDM). In addition to the impact of neutral lipids, the effect of apo E secretion on cholesterol efflux and cholesterol mobilization has been elegantly reported in mouse macrophages [41]. Moreover, a sustained 60% suppression of apo E secretion moderately reduced the cholesterol efflux to apoAI in primary human macrophages [42]. We showed that the endogenous apo E secretion was reduced in EPA cells compared with Std cells. Overall, we noted good relationships between apo E secretion and CE hydrolysis efficiency and between apo E secretion and 24 h ABCA1-mediated cholesterol efflux capacities. Our results suggest that the level of apo E secretion is an important parameter in determining the hydrolysis of stored CE and the subsequent FC efflux from human macrophages.

We then questioned whether EPA exerts or not an ABCA1 specific effect by using HDL as a cholesterol acceptor. By conducting 4 h or 24 h experiments with or without probucol, we were allowed to appreciate the participation of ABCA1-independent pathways (Cla-1 and ABCG1) in this process. As we expected, we observed that EPA membrane incorporation also reduced cholesterol efflux to HDL. This finding confirms that EPA by reducing CE hydrolysis in foam cells reduced the FC available for either ABCA1 transporter or Cla-1 and ABCG1 proteins.

They are several limitations to this study. We did not explore the fine mechanism(s) explaining the decrease in CE hydrolysis, because we measured a global CE hydrolase activity mediated by several enzymes. It would be of interest to explore the relative contribution of CES1 and NCEH1 in cholesterol-loaded HMDM supplemented or not with EPA without excluding the possibility that other lipolytic enzymes such as the recently described LD-associated hydrolase (LDAH) may be involved in this process [63]. This interesting point deserves an entire study. In addition, we cannot exclude the possibility that FAs induced modifications on constitutive proteins of lipid droplets such as perilipin or adipose differentiation-related protein (ADRP), which may alter the access of cellular enzymes to the lipid core. It would be worthwhile to isolate lipid droplets from

cholesterol-loaded HMDM supplemented or not with FAs to conduct proteomic analyses. Finally, we cannot rule out the possibility that the cellular increase in TG may decrease the cholesterol efflux by altering signaling pathways. Indeed, Palmer et al. previously reported the inhibitory effect of TG-rich lipoproteins on cholesterol efflux to apo AI in cholesterol-loaded THP-1 [64]. This effect did not appear to be mediated by changes in the rate of hydrolysis of stored cholesterol. The authors speculated that TG-rich lipoproteins may affect the activation, or expression, of components of the cell signaling pathway involved in cholesterol efflux.

## 5. Conclusion

This study shows for the first time that EPA reduces the ABCA1- and the Cla-1/ABCG1 mediated cholesterol efflux pathways from cholesterol-loaded HMDM by reducing the hydrolysis of CE. The reduced efficiency of cholesteryl esters hydrolysis is likely a result of increased cellular triglycerides and/or decreased apo E secretion. Moreover, we show that the membrane incorporation of other PUFAs (n-3 and n-6) was also able to reduce this anti-atherogenic pathway.

## Disclosures

None declared.

## Acknowledgments

The authors thank Sylviane Tardivel (EA 4529, UFR de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France) for her help with obtaining human macrophages and for her fruitful discussions during the preparation of this manuscript. We also thank Wilfried Le Goff (INSERM UMRS 1166, Hôpital de la Pitié, Paris, France) for his advice during the revision of this manuscript and Delphine Faussot (Laboratoire de Biochimie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France) for her technical assistance in cholesterol masses determinations by HPLC.

**References**

- [1] WHO, World Heart Federation, World Heart Organization (eds), Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva, Switzerland WHO (2011)
- [2] R. Ross, The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* 362 (1993) 801-809.
- [3] A. von Eckardstein, J.R. Nofer, G. Assmann, High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 13-27.
- [4] J.F. Oram, R.M. Lawn, ABCA1, the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol, *J. Lipid. Res.* 42 (2001) 1173-1179.
- [5] X. Wang, H.L. Collins, M. Ranalletta, I.V. Fuki, J.T. Billheimer, G.H. Rothblat, A.R. Tall, D.J. Rader, Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2216-2224.
- [6] A.R. Tall, Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins, *J. Intern. Med.* 263 (2008) 256-273.
- [7] S. Larrede, C.M. Quinn, W. Jessup, E. Frisdal, M. Olivier, V. Hsieh, M.J. Kim, M. Van Eck, P. Couvert, A. Carrie, P. Giral, M.J. Chapman, M. Guerin, W. Le Goff, Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 1930-1936.
- [8] S. Ghosh, B. Zhao, J. Bie, J. Song, Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis, *Vascul. Pharmacol.* 52 (2010) 1-10.
- [9] M. Ouimet, V. Franklin, E. Mak, X. Liao, I. Tabas, YL Marcel, Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase, *Cell Metab.* 13 (2011) 655-667.
- [10] D. Mozaffarian, J.H. Wu, Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events, *J. Am. Coll. Cardiol.* 58 (2011) 2047-2067.
- [11] Y. Nishizaki, K. Shimada, S. Tani, T. Ogawa, J. Ando, M. Takahashi, M. Yamamoto, T. Shinozaki, K. Miyauchi, K. Nagao, A. Hirayama, M. Yoshimura, I. Komuro, R. Nagai, H. Daida, Significance of imbalance in the ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids in patients with acute coronary syndrome, *Am. J. Cardiol.* 113 (2014) 441-445.

- [12] Y. Nagahara, S. Motoyama, M. Sarai, H. Ito, H. Kawai, Y. Takakuwa, M. Miyagi, D. Shibata, H. Takahashi, H. Naruse, J. Ishii, Y. Ozaki, Eicosapentaenoic acid to arachidonic acid (EPA/AA) ratio as an associated factor of high risk plaque on coronary computed tomography in patients without coronary artery disease, *Atherosclerosis* 250 (2016) 30-37.
- [13] D.D. Alexander, P.E. Miller, M.E. Van Elswyk, C.N. Kuratko, L.C. Bylsma, A meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies of eicosapentaenoic and docosahexaenoic long-chain omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk, *Mayo Clin. Proc.* 92 (2017) 15-29.
- [14] M. Yokoyama, H. Origasa H; JELIS Investigators, Effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in Japanese patients with hypercholesterolemia: rationale, design, and baseline characteristics of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS), *Am. Heart J.* 146 (2003) 613-620.
- [15] D. Kromhout, J. de Goede, Update on cardiometabolic health effects of  $\omega$ -3 fatty Acids, *Curr. Opin. Lipidol.* 25 (2014) 85-90.
- [16] I.B. Asztalos, J.A. Gleason, S. Sever, R. Gedik, B.F. Asztalos, K.V. Horvath, M.L. Dansinger, S. Lamon-Fava, E.J. Schaefer, Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular disease risk factors: a randomized clinical trial, *Metabolism* 65 (2016) 1636-1645.
- [17] M.E. Kleber, G.E. Delgado, S. Lorkowski, W. März, C. von Schacky, Omega-3 fatty acids and mortality in patients referred for coronary angiography. The Ludwigshafen risk and cardiovascular health study, *Atherosclerosis* 252 (2016) 175-181.
- [18] J.J. Rhee, E. Kim, J.E. Buring, T. Kurth, Fish consumption, omega-3 fatty acids, and risk of cardiovascular disease, *Am. J. Prev. Med.* 52 (2017) 10-19.
- [19] A. Zarubica, D. Trompier, G. Chimini, ABCA1, from pathology to membrane function, *Pflugers. Arch.* 453 (2007) 569-579.
- [20] S. Nandy, L. Ma, M. Denis, J. Karwatsky, Z. Li, X.C. Jiang, X. Zha, ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity, *J. Lipid. Res.* 50 (2009) 456-466.
- [21] N. Fournier, N. Attia, D. Rousseau-Ralliard, B. Védie, F. Destailats, A. Grynberg, J.-L. Paul, Deleterious impact of transelaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages, *Biochim. Biophys. Acta* 1821 (2012) 303-312.
- [22] A. Doublet, V. Robert, B. Védie, D. Rousseau-Ralliard, A. Reboulleau, A. Grynberg, J.-L. Paul, N. Fournier, Contrasting effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid membrane incorporation into cardiomyocytes on free cholesterol turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 1413-1421.

- [23] N. Fournier, S. Tardivel, J.-F. Benoist, B. Védie, D. Rousseau-Ralliard, M. Nowak, F. Allaoui, J.-L. Paul, Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux via a protein kinase A signaling pathway in primary human macrophages, *Biochim. Biophys. Acta* 1861 (2016) 331-341.
- [24] S.K. Basu, J.L. Goldstein, G.W. Anderson, M.S. Brown, Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3178-3182.
- [25] A. Reboulleau, V. Robert, B. Védie, A. Doublet, A. Grynberg, J.-L. Paul, N. Fournier, Involvement of cholesterol efflux pathway in the control of cardiomyocytes cholesterol homeostasis, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53 (2012) 196-205.
- [26] A.H. Terpstra, R.J. Nicolosi, P.N. Herbert, In vitro incorporation of radiolabeled cholesteryl esters into high and low density lipoproteins, *J. Lipid Res.* 30 (1989) 1663-1671.
- [27] E. Girard, J.-L. Paul, N. Fournier, P. Beaune, L. Johannes, C. Lamaze, B. Védie, The dynamin chemical inhibitor dynasore impairs cholesterol trafficking and sterol-sensitive genes transcription in human HeLa cells and macrophages, *PLoS ONE* 6 (2011) e29042.
- [28] E. Favari, I. Zanotti, F. Zimetti, N. Ronda, F. Bernini, G.H. Rothblat, Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 2345-2350.
- [29] S.R. Freeman, X. Jin, J.J. Anzinger, Q. Xu, S. Purushothaman, M.B. Fessler, L. Addadi, H.S. Kruth, ABCG1-mediated generation of extracellular cholesterol microdomains. *J. Lipid Res.* 55 (2014) 115-127.
- [30] A. Grynberg, G. Nalbone, J. Leonardi, H. Lafont, P. Athias, Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in cultured rat ventricular myocytes and hypoxia-induced alterations of phospholipase-A activity, *Mol. Cell. Biochem.* 116 (1992) 75-78.
- [31] H.C. Pinkart, R. Devereux, P.J. Chapman, Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns, *Journal of Microbiological Methods* 34 (1998) 9-15.
- [32] N. Fournier, O. Francone, G. Rothblat, D. Goudouneche, M. Cambillau, G. Kellner-Weibel, P. Robinet, L. Royer, N. Moatti, A. Simon, J.-L. Paul, Enhanced efflux of cholesterol from ABCA1-expressing macrophages to serum from type IV hypertriglyceridemic subjects, *Atherosclerosis* 171 (2003) 287-293.
- [33] M. Nowak, S. Tardivel, K. Sayegrih, V. Robert, S. Abreu, P. Chaminade, S. Vicca, A. Grynberg, B. Lacour, Impact of polyunsaturated fatty acids on oxidized low density lipoprotein-induced U937 cell apoptosis, *J. Atheroscler. Thromb.* 18 (2011) 494-503.

- [34] G. Kellner-Weibel, M. de La Llera-Moya, M.A. Connelly, G. Stoudt, A.E. Christian, M.P. Haynes, D.L. Williams, G.H. Rothblat, Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution, *Biochemistry* 39 (2000) 221-229.
- [35] M. Moulin, A. Solgadi, V. Veksler, A. Garnier, R. Ventura-Clapier, P. Chaminade, Sex-specific cardiac cardioliipin remodeling after doxorubicin treatment, *Biol. Sex. Differ.* 15 (2015) 6-20.
- [36] L. Kritharides, A. Christian, G. Stoudt, D. Morel, G.H. Rothblat, Cholesterol metabolism and efflux in human THP-1 macrophages, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1999) 1589-1599.
- [37] S.J. Avart, D.W. Bernard, W.G. Jerome, J.M. Glick, Cholesteryl ester hydrolysis in J774 macrophages occurs in the cytoplasm and lysosomes, *J. Lipid. Res.* 40 (1999) 405-414.
- [38] B. Muralidhar, K.L. Carpenter, K. Müller, J.N. Skepper, M.J. Arends, Potency of arachidonic acid in polyunsaturated fatty acid-induced death of human monocyte-macrophages: implications for atherosclerosis, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 71 (2004) 251-262.
- [39] T. Martins de Lima, M.F. Cury-Boaventura, G. Giannocco, M.T. Nunes, R. Curi, Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774), *Clin. Sci. (Lond.)* 111 (2006) 303-317.
- [40] Y.W. Hu, X. Ma, X.X. Li, X.H. Liu, J. Xiao, Z.C. Mo, J. Xiang, D.F. Liao, C.K. Tang, Eicosapentaenoic acid reduces ABCA1 serine phosphorylation and impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells, *Atherosclerosis* 204 (2009) e35-43.
- [41] C. Langer, Y. Huang, P. Cullen, B. Wiesenhütter, R.W. Mahley, G. Assmann, A. von Eckardstein, Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages, *J. Mol. Med. (Berl)* 78 (2000) 217-227.
- [42] D.A. Elliott, W.S. Kim, D.A. Jans, B. Garner, Macrophage apolipoprotein-E knockdown modulates caspase-3 activation without altering sensitivity to apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 145-153.
- [43] G. Schmitz, J. Ecker, The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 47 (2008) 147-155.
- [44] P.C. Calder, Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance, *Biochim. Biophys. Acta* 1851 (2015) 469-484.
- [45] J. Gall, E. Frisdal, R. Bittar, W. Le Goff, E. Bruckert, P. Lesnik, M. Guerin, P. Giral, Association of cholesterol efflux capacity with clinical features of metabolic syndrome: relevance to atherosclerosis, *J. Am. Heart Assoc.* 5 (2016) e004808.

- [46] N. Brownell, A. Rohatgi, Modulating cholesterol efflux capacity to improve cardiovascular disease, *Curr. Opin. Lipidol.* 27 (2016) 398-407.
- [47] A. Rohatgi, A. Khera, J.D. Berry, E.G. Givens, C.R. Ayers, K.E. Wedin, I.J. Neeland, I.S. Yuhanna, D.R. Rader, J.A. de Lemos, P.W. Shaul, HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 2383-2393.
- [48] M.R. Hayden, S.M. Clee, A. Brooks-Wilson, J. Genest Jr., A. Attie, J.J. Kastelein, Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency, *Curr. Opin. Lipidol.* 11 (2000) 117-122.
- [49] S.R. Witting, J.N. Maiorano, W.S. Davidson, Ceramide enhances cholesterol efflux to apolipoprotein A-I by increasing the cell surface presence of ATP-binding cassette transporter A1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40121-40127.
- [50] K. Nagao, K. Takahashi, K. Hanada, N. Kioka, M. Matsuo, K. Ueda, Enhanced apoA-I-dependent cholesterol efflux by ABCA1 from sphingomyelin-deficient Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14868-14874.
- [51] W.D. Sweet, F. Schroeder, Polyunsaturated fatty acids alter sterol transbilayer domains in LM fibroblast plasma membrane, *FEBS Lett.* 229 (1988) 188-192.
- [52] S.C. Rumsey, N.F. Galeano, B. Lipschitz, R.J. Deckelbaum, Oleate and other long chain fatty acids stimulate low density lipoprotein receptor activity by enhancing acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase activity and altering intracellular regulatory cholesterol pools in cultured cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 10008-10016.
- [53] J.A. Crow, B.L. Middleton, A. Borazjani, M.J. Hatfield, P.M. Potter, M.K. Ross, Inhibition of carboxylesterase 1 is associated with cholesteryl ester retention in human THP-1 monocyte/macrophages, *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (2008) 643-654.
- [54] M. Igarashi, J. Osuga, H. Uozaki, M. Sekiya, S. Nagashima, M. Takahashi, S. Takase, M. Takanashi, Y. Li, K. Ohta, M. Kumagai, M. Nishi, M. Hosokawa, C. Fledelius, P. Jacobsen, H. Yagyu, M. Fukayama, R. Nagai, T. Kadowaki, K. Ohashi, S. Ishibashi, The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages, *Circ. Res.* 107 (2010) 1387-1395.
- [55] B. Zhao, J. Bie, J. Wang, S.A. Marqueen, S. Ghosh, Identification of a novel intracellular cholesteryl ester hydrolase (carboxylesterase 3) in human macrophages: compensatory increase in its expression after carboxylesterase 1 silencing, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 303 (2012) C427-435.

- [56] J.A. Crow, K.L. Herring, S. Xie, A. Borazjani, P.M. Potter, M.K. Ross, Inhibition of carboxylesterase activity of THP1 monocytes/macrophages and recombinant human carboxylesterase 1 by oxysterols and fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) 31-41.
- [57] J.M. Glick, S.J. Adelman, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, Cellular cholesteryl ester clearance. Relationship to the physical state of cholesteryl ester inclusions, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 13425-13430.
- [58] S.J. Adelman, J.M. Glick, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, Lipid composition and physical state effects on cellular cholesteryl ester clearance, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 13844-13850.
- [59] F.H. Mahlberg, J.M. Glick, W.G. Jerome, G.H. Rothblat, Metabolism of cholesteryl ester lipid droplets in a J774 macrophage foam cell model, *Biochim. Biophys. Acta.* 1045 (1990) 291-298.
- [60] A.T. Lada, L.L. Rudel, R.W. St Clair, Effects of LDL enriched with different dietary fatty acids on cholesteryl ester accumulation and turnover in THP-1 macrophages, *J. Lipid. Res.* 44 (2003) 770-779.
- [61] B. Zhao, B.J. Fisher, R.W. St Clair, L.L. Rudel, S. Ghosh, Redistribution of macrophage cholesteryl ester hydrolase from cytoplasm to lipid droplets upon lipid loading, *J. Lipid. Res.* 46 (2005) 2114-2121.
- [62] A.T. Lada, M.C. Willingham, R.W. St Clair, Triglyceride depletion in THP-1 cells alters cholesteryl ester physical state and cholesterol efflux, *J. Lipid. Res.* 43 (2002) 618-628.
- [63] Y.H. Goo, S.H. Son, P.B. Kreienberg, A. Paul, Novel lipid droplet-associated serine hydrolase regulates macrophage cholesterol mobilization, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (2014) 386-396.
- [64] A.M. Palmer, N. Murphy, A. Graham, Triglyceride-rich lipoproteins inhibit cholesterol efflux to apolipoprotein (apo) A1 from human macrophage foam cells, *Atherosclerosis* 173 (2004) 27-38.

**Figure captions****Figure 1. Impact of FA membrane incorporation on ABCA1-mediated cholesterol efflux from cholesterol-loaded HMDM.**

Human macrophages were incubated for 32 h with either 70  $\mu$ M eicosapentaenoic acid (EPA), 15  $\mu$ M docosapentaenoic acid (DPA), 15  $\mu$ M docosahexaenoic acid (DHA), 50  $\mu$ M arachidonic acid (AA), 70  $\mu$ M oleic acid or 70  $\mu$ M palmitic acid (Palm) in the experimental media. Std cells were maintained untreated in the standard culture medium. HMDM were cholesterol-loaded by incubation with 75  $\mu$ g/ml of acLDL for 24 h added to the experimental media supplemented with or without FAs. After an overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid, the cells were incubated with 15  $\mu$ g/ml apo AI for 4 h. Fractional cholesterol efflux is expressed as the mean  $\pm$  SEM of nine determinations (triplicate from three different preparations).

Std, standard cells; acLDL, acetylated LDL; apo AI, apolipoprotein AI; NS, not significant; \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  vs Std.

**Figure 2. Impact of EPA membrane incorporation on ABCA1-mediated cholesterol efflux from cholesterol-loaded HMDM.**

Human macrophages were incubated for 32 h with 70  $\mu$ M eicosapentaenoic acid (EPA) in the experimental medium. Std cells were maintained untreated in the standard culture medium. HMDM were cholesterol-loaded by incubation with 75  $\mu$ g/ml of acLDL for 24 h added to the experimental media supplemented with or without EPA. After an overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid, the cells were incubated with RPMI alone or 15  $\mu$ g/ml apo AI for 4 h (A) or 24 h (B). Cholesterol efflux to the medium (basal efflux) was subtracted from cholesterol efflux to apo AI to yield apo AI-specific efflux. Fractional cholesterol efflux is expressed as the mean  $\pm$  SEM of 45 determinations (triplicate from 15 different preparations).

Std, standard cells; acLDL, acetylated LDL; apo AI, apolipoprotein AI

**Figure 3. Impact of EPA membrane incorporation on cholesterol efflux to HDL from cholesterol-loaded HMDM.**

Human macrophages were incubated for 32 h with 70  $\mu$ M eicosapentaenoic acid (EPA) in the experimental medium. Std cells were maintained untreated in the standard culture medium. HMDM were cholesterol-loaded by incubation with 75  $\mu$ g/ml of acLDL for 24 h added to the experimental media supplemented with or without EPA. After an overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid in the presence or absence (no drug) of 10  $\mu$ M probucol, the cells were incubated with increasing amounts of HDL (15, 50 and 125  $\mu$ g/ml HDL-PL) in the presence or

absence of 10  $\mu$ M probucol for 4 h (A and B) or 24 h (C and D). Fractional cholesterol efflux is expressed as the mean  $\pm$  SEM of nine determinations (triplicate from three different preparations).

Std, standard cells; acLDL, acetylated LDL; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  and \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs Std. Where not visible, the error bars are smaller than the plotting symbols.

**Figure 4. Impact of EPA membrane incorporation on ABCA1-mediated cholesterol efflux from free cholesterol (FC)-loaded HMDM.**

Human macrophages were incubated for 32 h with 70  $\mu$ M eicosapentaenoic acid (EPA) in the experimental medium. Std cells were maintained untreated in the standard culture medium. HMDM were enriched in FC by incubation with 75  $\mu$ g/ml of acLDL for 24 h added to the experimental media supplemented with or without EPA in the presence or absence (no drug) of 2  $\mu$ g/ml of Sandoz 58035 ACAT inhibitor (ACATi). The ACATi was maintained during the subsequent overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid and during the efflux to 15  $\mu$ g/ml apo AI for 4 h (A) or 24 h (B). Fractional cholesterol efflux is expressed as the mean  $\pm$  SEM of nine determinations (triplicate from three different preparations).

Std, standard cells; acLDL, acetylated LDL; apo AI, apolipoprotein AI; FC, free cholesterol; NS, not significant; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs no drug.

**Figure 5. Impact of EPA membrane incorporation on the esterification of cholesterol from cholesterol-loaded HMDM.**

Human macrophages were incubated for 32 h with 70  $\mu$ M eicosapentaenoic acid (EPA) in the experimental medium. Std cells were maintained untreated in the standard culture medium. HMDM were cholesterol-loaded by incubation with 75  $\mu$ g/ml of acLDL for 24 h added to the experimental media supplemented with or without EPA. After an overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid, the cells were incubated with 15  $\mu$ g/ml apo AI for 24 h in the presence or absence (no drug) of 2  $\mu$ g/ml of Sandoz 58035 ACAT inhibitor (ACATi). Fractional cholesterol efflux is expressed as the mean  $\pm$  SEM of nine determinations (triplicate from three different preparations).

Std, standard cells; acLDL, acetylated LDL; apo AI, apolipoprotein AI; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs no drug.

**Figure 6. Impact of EPA membrane incorporation on the hydrolysis of CE in cholesterol-loaded HMDM.**

Human macrophages were incubated for 32 h with 70  $\mu$ M eicosapentaenoic acid (EPA) in the experimental medium. Std cells were maintained untreated in the standard culture medium. HMDM were cholesterol-loaded by incubation with 75  $\mu$ g/ml of acLDL for 24 h added to the experimental

media supplemented with or without EPA. After an overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid, some monolayers were further incubated with RPMI 1640 medium for 24 h in the presence of 2 µg/ml of Sandoz 58035 ACAT inhibitor (ACATi). The CE clearance expressed as nmol/mg proteins/24 h (A) was estimated by the differences of CE masses between the beginning and the end of this period (B). Results represent the means ± SEM of six independent experiments.

Std, standard cells; acLDL, acetylated LDL; CE, cholesteryl esters

**Figure 7. Relationships between cellular TG or CE contents, hydrolysis of CE and free cholesterol efflux in cholesterol-loaded HMDM.**

Human macrophages were incubated for 32 h with either 70 µM eicosapentaenoic acid (EPA), 140 µM EPA, 50 µM arachidonic acid (AA), 70 µM oleic acid or 70 µM palmitic acid in the experimental media. Std cells were maintained untreated in the standard culture medium. HMDM were cholesterol-loaded by incubation with 75 µg/ml of acLDL for 24 h added to the experimental media supplemented with or without FAs. After an overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid, some monolayers were used to measure TG or CE contents. The TG or CE contents fold increase represents the ratio of TG or CE in FA-treated cells to TG or CE in Std cells. Some other monolayers were further incubated with RPMI 1640 medium for 24 h in the presence of 2 µg/ml of Sandoz 58035 ACAT inhibitor (ACATi) to calculate the hydrolysis of CE. Some cells were also incubated with 15 µg/ml apo AI for 24 h to determine the fractional cholesterol efflux. The effects of the FA on hydrolysis of CE and on cholesterol efflux are expressed as % of decrease between the FA-treated cells and Std cells.

Std, standard cells; acLDL, acetylated LDL; TG, triglycerides; CE, cholesteryl esters; FA, fatty acids; apo AI, apolipoprotein AI.

◆ EPA 70, ■ EPA 140, ● oleic 70, ▲ AA 50, ◇ palmitic 70

**Figure 8. Relationships between apo E secretion, hydrolysis of CE and free cholesterol efflux in cholesterol-loaded HMDM.**

Human macrophages were incubated for 32 h with either 70 µM eicosapentaenoic acid (EPA), 50 µM arachidonic acid (AA) or 70 µM oleic acid in the experimental media. Std cells were maintained untreated in the standard culture medium. HMDM were cholesterol-loaded by incubation with 75 µg/ml of acLDL for 24 h added to the experimental media supplemented with or without FAs. After an overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid, the supernatants were collected to measure apo E secretion and some monolayers were used to measure CE contents. Some other monolayers were further incubated with RPMI 1640 medium for 24 h in the presence of 2 µg/ml of Sandoz 58035 ACAT inhibitor (ACATi) to calculate the percentage of CE hydrolyzed.

29

Some cells were also incubated with 15  $\mu\text{g/ml}$  apo AI for 24 h to determine the fractional cholesterol efflux.

Std, standard cells; acLDL, acetylated LDL; FA, fatty acids; CE, cholesteryl esters; apo AI, apolipoprotein AI.

□ Std, ◆ EPA 70, ● oleic 70, ▲ AA 50

ACCEPTED MANUSCRIPT

**Table 1**  
Fatty acid composition of membrane phospholipids from cholesterol-loaded HMDM

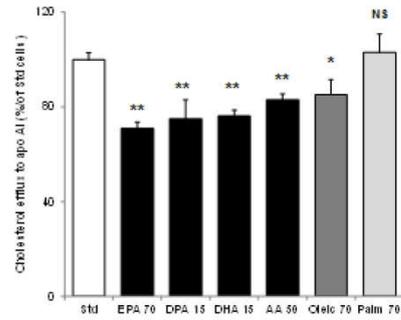
	Std	EPA 70
C16:0	24.81 ± 1.42	26.47 ± 1.67
C16:1	1.73 ± 0.21	1.07 ± 0.17
C18:0	24.56 ± 1.64	28.32 ± 1.37
C18:1	13.04 ± 1.08	9.59 ± 0.68
C18:2 n-6	5.99 ± 0.63	4.23 ± 0.30
C20:3	3.90 ± 0.40	3.04 ± 1.02
<b>C20:4 n-6 (AA)</b>	13.32 ± 1.99	<b>5.50 ± 0.81</b>
<b>C20:5 n-3 (EPA)</b>	4.65 ± 1.67	<b>13.00 ± 1.48</b>
<b>C22:5 n-3 (DPA)</b>	1.60 ± 0.33	<b>5.52 ± 0.70</b>
C22:6 n-3 (DHA)	3.59 ± 0.67	2.35 ± 0.45
<i>Others</i>	2.80	0.90
Σ SFA	51.20 ± 3.07	55.40 ± 3.05
Σ MUFA	15.74 ± 1.55	10.95 ± 1.20
Σ PUFA	33.06 ± 4.13	33.65 ± 4.37
UI	145.5 ± 9.8	157.3 ± 9.7
(MUFA+PUFA)/SFA	0.95 ± 0.15	0.81 ± 0.13

Human macrophages were incubated for 32 h with 70 μM eicosapentaenoic acid (EPA 70) in the experimental medium. Std cells were maintained in the standard culture medium. HMDM were cholesterol-loaded by incubation with 75 μg/ml of acLDL for 24 h added to the experimental medium supplemented with or without EPA. After an overnight equilibration with 22-hydroxy-cholesterol and 9-cis-retinoic acid followed by a lipid extraction, phospholipids were separated and the FA were trans-methylated for gas chromatography analysis coupled to mass spectrometry. Each fatty acid was expressed as the percentage of total FA, and the data are expressed as the mean ± SEM of 14 determinations (two wells per culture in seven different preparations). Fatty acids that comprised less than 1% were not listed but were included in the calculations. Fatty acids of interest are written in bold characters.

UI (unsaturation index): Σ (% unsaturated fatty acids X number of double bonds)

FA, fatty acid; Std, standard cells; AA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

Figure 1



ACCEPTED

SCRIPT

Figure 2

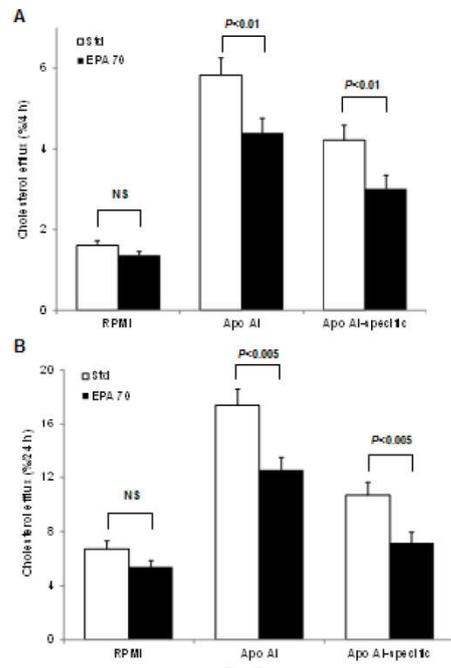


Figure 3

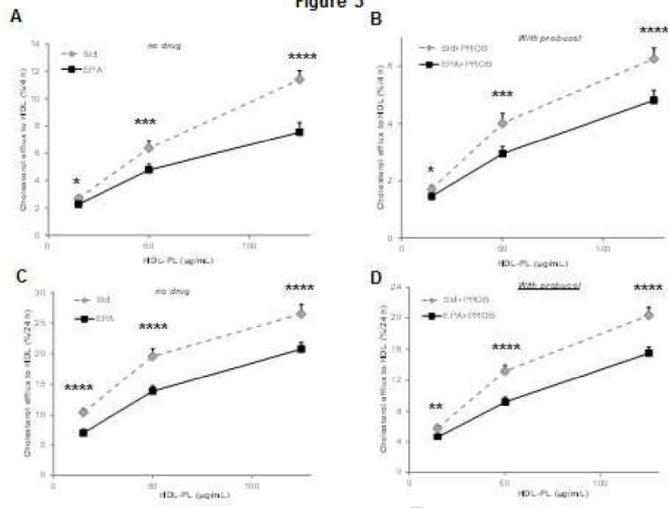


Figure 4

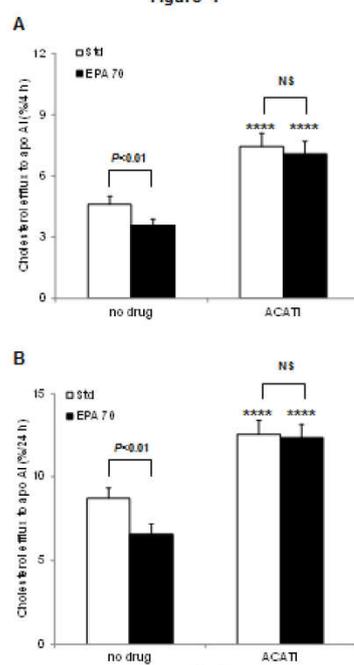
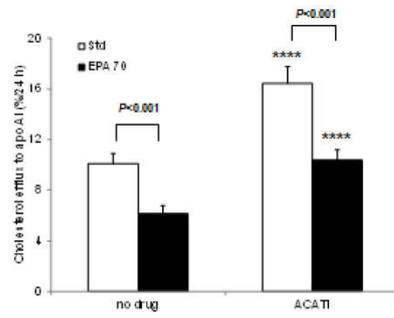


Figure 5



SCRIPT

ACCEPTED

Figure 6

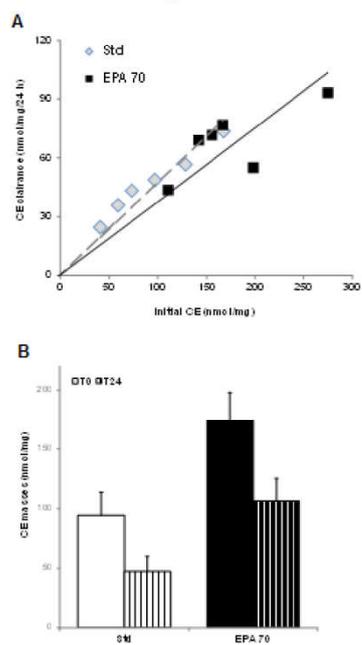


Figure 7

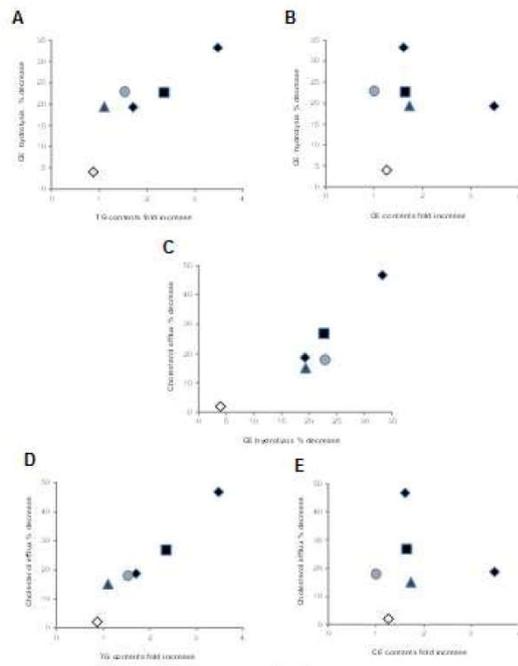
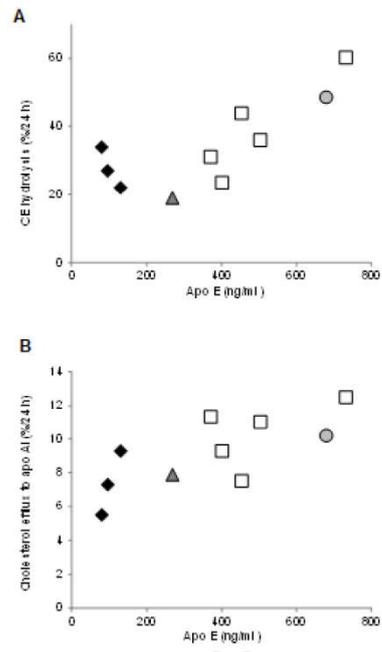


Figure 8



**Highlights**

Diet high in n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) ratio is cardioprotective.

We studied the impact of PUFA membrane incorporation on cholesterol efflux.

We used cholesteryl esters (CE)-loaded primary human macrophages to mimic foam cells.

All tested PUFA reduced the cholesterol efflux by reducing the hydrolysis of CE.

Eicosapentaenoic acid (EPA) reduced CE hydrolysis likely because of the increased cellular triglycerides and/or decreased apolipoprotein E secretion.



# **Chapitre 7 : Phospholipides oxydés : généralités, étude préliminaire**

# 1 Généralités

Les résultats présentés lors du chapitre 5 ont montré que l'apport chronique d'EPA dans des cultures de macrophages humains entraîne un profond remodelage des PL membranaires, modifiant préférentiellement les AGPI à 20 atomes de carbone. Ce groupe d'AG occupe une place très importante dans le métabolisme cellulaire en tant que précurseurs d'une classe de lipides : les eicosanoïdes. Ces AG oxydés constituent une famille très diverse et sont particulièrement étudiés dans le contexte des maladies inflammatoires dont fait partie l'athérosclérose. Au regard de leurs propriétés physico-chimiques, l'analyse des AG oxydés représente un véritable défi, d'autant plus qu'ils peuvent réagir avec des PL pour créer des phospholipides oxydés (oxPL).

Ce terme phospholipides oxydés a été employé pour la première fois en 1938 par Frederik Bernheim<sup>383</sup> pour décrire les composés formés à partir de la mise en contact de tissu biologique comme le cerveau, le foie ou le cœur avec des sels de vanadium : il s'agissait de décrire l'ajout d'un atome d'oxygène sur des tissus vivants. Depuis, ces composés ont été identifiés dans les liquides biologiques, les cellules et les tissus. La théorie de l'addition radicalaire et de la peroxydation lipidique a permis d'expliquer leur formation. Ces molécules jouent également un rôle important dans les réactions inflammatoires, les infections<sup>384</sup> ou la réponse immunitaire<sup>384-390</sup>. Etrangement, le nombre de publications correspondant à ce thème reste faible (Figure 79)<sup>391</sup>.

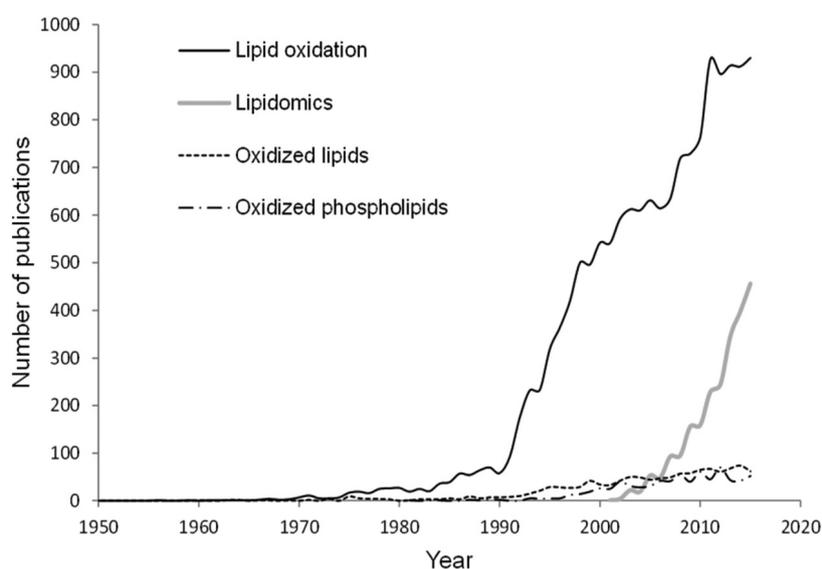


Figure 79 : Nombre de publications sur la thématique des lipides oxydés, phospholipides oxydés, de la lipidomique et sur l'oxydation des lipides<sup>391</sup>

Le développement de cette thématique est limité par les méthodes mises au point pour l'analyse de ces composés. Comme les eicosanoïdes, les oxPL ont des structures très diverses, labiles et en faible concentration dans l'organisme. La consultation de la classification LipidMaps fait

apparaître quelques dizaines de structures d'oxPL mais cette apparente simplicité est assez rapidement contredite.

Les oxPL ont pour origine l'attaque des AGPI par des radicaux libres ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{OONO}^\bullet$  ou  $\text{O}_2^\bullet$ ). Elle conduit à la formation d'une réaction radicalaire qui est classiquement décrite en trois étapes : initiation, propagation et terminaison<sup>392</sup>. Le réarrangement des hydroperoxydes conduit à un mélange d'oxPL sous forme racémique. L'origine de cette réactivité est due à la présence de la double liaison carbone-carbone des chaînes d'AG. Concernant les AGPI, cette réactivité devient importante. L'attaque des AGPI peut être aussi d'origine enzymatique (myéloperoxydase, NADPH oxydase ou xanthine oxydase). Ces réactions sont beaucoup plus spécifiques puisqu'elles peuvent former un seul énantiomère<sup>393</sup>. Cette double origine conduit, dans tous les cas, à un réarrangement des chaînes d'AG menant à la production de nouvelles espèces biologiquement actives<sup>394</sup>.

Quatre classes d'oxPL ont été proposées par Davies *et al.*<sup>395</sup>, comme le montre la Figure 80. Classe I : ajout d'un groupement oxygène ; Classe II : une des chaînes d'AG a été rompue à la suite du réarrangement ; Classe III : cyclisation d'une des chaînes d'AG et Classe IV : oxydation portant sur la tête polaire.

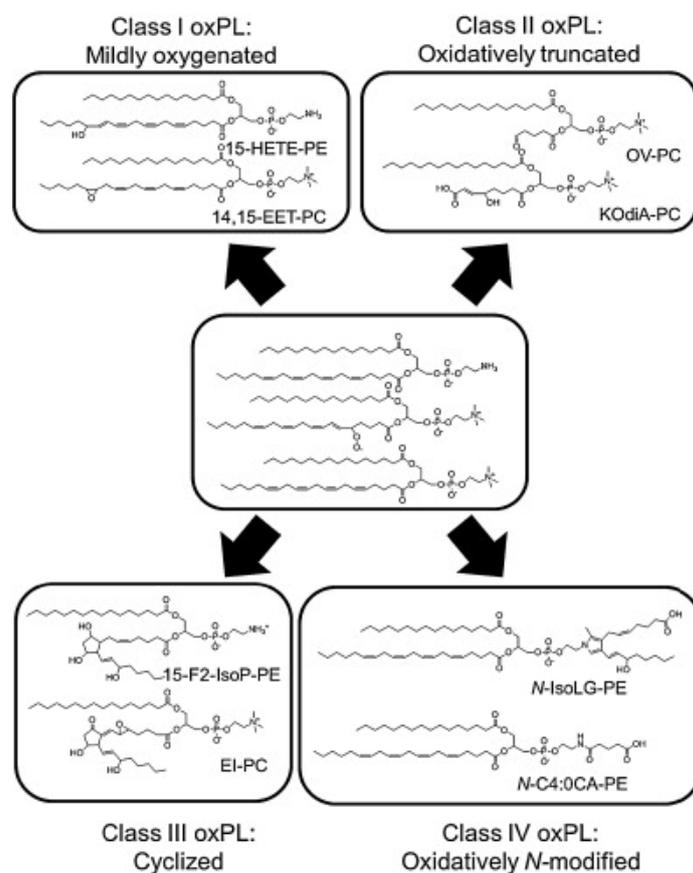


Figure 80 : Classification des phospholipides oxydés<sup>395</sup>

Cette classification n'est cependant pas exhaustive. En effet, lorsqu'un oxPL de la classe II est formé, la rupture de l'AGPI produit des dérivés aldéhydes à chaînes courtes (comme le 4-hydroxy-2-hexénal ou 4-hydroxy-2-nonénal). Ces molécules sont considérées comme des marqueurs de la peroxydation lipidique d'AG  $\omega 3$  ou  $\omega 6$  qui sont reconnus pour être capables de se fixer sur des résidus, lysine, cystéine ou histidine<sup>396-400</sup>. Par ailleurs, les réactions avec l'acide hypochloreux et les oxydes nitreux avec les PL forment des dérivés chlorés ou nitrés<sup>401-404</sup>. Ainsi, pour un PL, des dizaines d'oxPL peuvent être formés avec des gammes de masses très variées. Ces produits d'oxydation incluent des fonctions alcools, carbonyles, hydroperoxydes et acides carboxyliques. Leur caractère polaire plus marqué que les PL natifs augmente la polarité de l'interface entre les lipides et l'eau, accroisse la présence de charge négative à la surface de la membrane et ainsi améliore les capacités d'agrégation et de fusion des membranes<sup>405-408</sup>.

Il est actuellement reconnu que cette catégorie de PL est produite au cours des maladies inflammatoires telles que les maladies neurodégénératives ou rhumatoïdes mais aussi dans le diabète et l'athérosclérose<sup>384</sup>. En effet, les oxPL pourraient être impliqués dans le phénomène d'activation plaquettaire (platelet activating factor ou PAF), moduler la réponse inflammatoire, servir de ligand à des récepteurs CD36, avoir une influence sur les cellules endothéliales<sup>390,409-422</sup> ou être responsables d'une différenciation particulière des macrophages (OxPL-induced macrophage phenotype ou Mox<sup>423</sup>) (Figure 81).

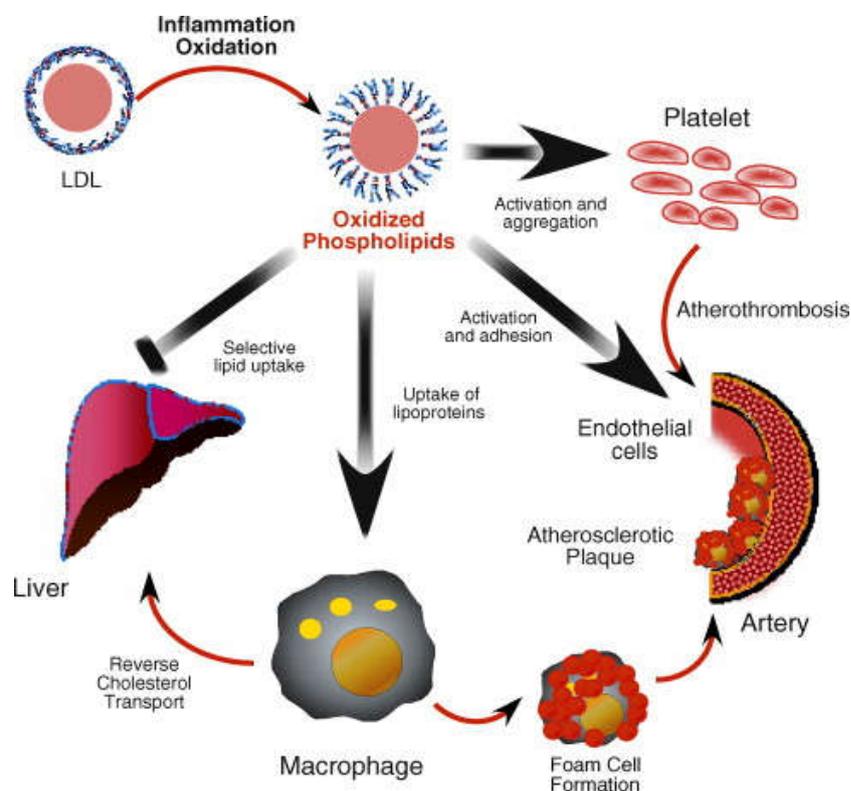


Figure 81 : Effets des phospholipides oxydés sur les réactions inflammatoires menant à l'athérosclérose

L'analyse de ces composés a tout d'abord été réalisée par l'étude de l'oxydation des liposomes avec les PC comme composant majoritaire. Des études récentes ont étendu les investigations vers d'autres classes de PL et même les sphingolipides. En effet, l'oxydation peut porter sur les têtes polaires comme la choline, la sérine ou même la partie glycosylée des glycosphingolipides<sup>391,424-427</sup>.

Des études ont été réalisées afin de déterminer la quantité d'oxPL dans le plasma de patient sain. Le dosage de ces composés en spectrométrie de masse montre que la concentration d'hydroperoxydes de PC (PC-OOH) est de l'ordre de 16 à 160 nmol.L<sup>-1</sup> et pour les hydroperoxydes de PE (PE-OOH), cette concentration est de l'ordre de 120 à 180 pmol.L<sup>-1</sup>. Ces concentrations, extrêmement faibles, peuvent augmenter dans des situations pathologiques telles que des patients alcooliques, hyperlipidémiques ou chez des patients atteints de cancer. Ainsi, la concentration des oxPL peut évoluer au cours de situations physiopathologiques mais actuellement aucune donnée concernant la variation de ces molécules n'a été recueillie en fonction par exemple de l'âge, du sexe, du tissu ou même de la cellule concernée<sup>391</sup>.

Contrairement aux eicosanoïdes, il existe très peu de composés références d'oxPL, il est donc nécessaire de préparer ses propres standards. Les méthodes d'oxydation des PL ont principalement été mises au point en milieu aqueux. L'utilisation de liposome est intéressante puisqu'elle constitue un modèle d'étude beaucoup plus simple qu'un échantillon biologique. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer la formation des produits d'oxydation. Les paramètres majeurs sont la concentration, la durée d'exposition et la nature du système oxydant. En effet, ils influencent qualitativement et quantitativement la formation des oxPL. Par ailleurs, il est établi que les liposomes multilamellaires et le feuillet interne d'une bicouche phospholipidique sont plus résistants aux agents d'oxydation<sup>428</sup>.

Un ensemble de techniques peut être considéré pour évaluer le degré d'oxydation. En effet, la fixation d'un groupement chromophore ou fluorophore est envisageable mais ces réactions manquent de spécificité et les informations structurales ne sont pas accessibles<sup>429-431</sup>. Par ailleurs, la chimiluminescence est largement employée afin de suivre la formation des hydroperoxydes pour l'analyse des dérivés oxydés d'AG, de PL et du cholestérol. Les méthodes spectrales peuvent aussi être considérées mais c'est la spectrométrie de masse qui est la plus largement utilisée<sup>432-439</sup>. En effet, l'addition d'un groupement hydroperoxyde correspond à un ajout de 32 unités de masse<sup>440,441</sup>. La modification des spectres est aussi valable pour les autres classes d'oxPL, les dérivés chlorés ou nitrés<sup>404,442</sup>. Chaque ion d'oxPL sera détecté à condition que la résolution du spectromètre le permette. Pour les ions isobares, l'emploi de l'ultra-haute résolution où de la fragmentation permettra de distinguer ces molécules.

Malgré les avantages de la spectrométrie de masse, il est courant de coupler cette détection à une séparation chromatographique. Les supports envisagés devront être particulièrement efficaces afin de distinguer différents isomères de position. Les méthodes de RP-LC<sup>443-450</sup> ou HILIC<sup>451</sup> sont privilégiées puisque le couplage à la spectrométrie de masse est plus aisé. Les supports sont principalement des C18 ou C8. Les oxPL auront des temps de rétention plus faibles que les PL natifs. Les solvants sont constitués d'un mélange de tampon aqueux dans du méthanol ou de l'acétonitrile, avec un autre cosolvant comme l'hexane isopropanol.

L'objectif de cette partie est d'analyser des oxPL sur le système chromatographique utilisé au cours de cette thèse. Profitant de la double détection Corona spectrométrie de masse ultra-haute résolution nous avons pu vérifier si les méthodes d'oxydation choisies ont permis de créer des dérivés oxydés et d'observer leurs profils de rétention sur le support polyvinylalcool.

## **2 Analyses des phospholipides oxydés en chromatographie liquide à polarité de phases normale**

### **2.1 Matériel et méthodes**

#### **2.1.1 Standards**

Les mélanges de standards de phospholipides naturels qui ont été utilisés pour les analyses LC-MS proviennent de chez Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Saint-Quentin-Fallavier, France) pour le glycérophosphatidylinositol (PI) et la L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-sérine (PS), la L- $\alpha$ -glycérophosphatidyléthanolamine (PE) (extrait de foie de bovin) et la L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC) (extrait de jaune d'œuf). Les standards monomoléculaires sont obtenus chez AventiPolarLipid<sup>®</sup> comme le 1,2-dilinolénoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ou PC(18:3/:18:3), le 1,2-diarachidonoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ou PC(20:4/20:4), le 1,2-didocosahexaénoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ou PC(22:6/22:6) et la 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valéroyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine ou PC(16:0/5:0<sub>CHO</sub>) ou POVPC. Les standards ont été préparés à la concentration initiale de 0,5 g.L<sup>-1</sup> dans un mélange chloroforme/méthanol (2 :1 ; v/v). Tous les analytes ont été conservés à une température de -20 °C.

## 2.1.2 Solvants

Les solvants sont identiques à ceux utilisés dans le chapitre 4 (paragraphe 2.2.2).

## 2.1.3 Protocole d'oxydation des phospholipides

Les PL ont été oxydés de deux façons. La première consiste à utiliser le dihydrochlorure de 2,2'-Azobis 2-méthylpropionamide ou (AAPH) obtenus chez Sigma-Aldrich. A 100  $\mu\text{L}$  de chaque standard de PL déposés dans différents récipients en verre, 1,4 mL d'une solution d'AAPH a été ajouté. Pour chaque échantillon, le temps de réaction est de 3 heures, la molarité de l'AAPH est 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , préparé dans un tampon phosphate à pH 7,4.

La seconde méthode d'oxydation consiste à ajouter 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide hypochloreux obtenu chez Sigma-Aldrich<sup>®</sup> contenant entre 6 et 14 % de chlore actif et 100  $\mu\text{L}$  de PL. La solution est complétée à 1,5 mL avec un tampon phosphate à pH 7,4. Le temps de réaction pour cette méthode est d'une heure.

Dans les deux cas, la réaction a été arrêtée en ajoutant 2 mL d'un mélange de chloroforme/méthanol (2 :1 ; v/v) suivi d'une évaporation à sec et reprise de l'extrait sec dans 250  $\mu\text{L}$  d'un mélange de chloroforme/méthanol (2 :1 ; v/v).

## 2.1.4 Chromatographie liquide et spectrométrie de masse

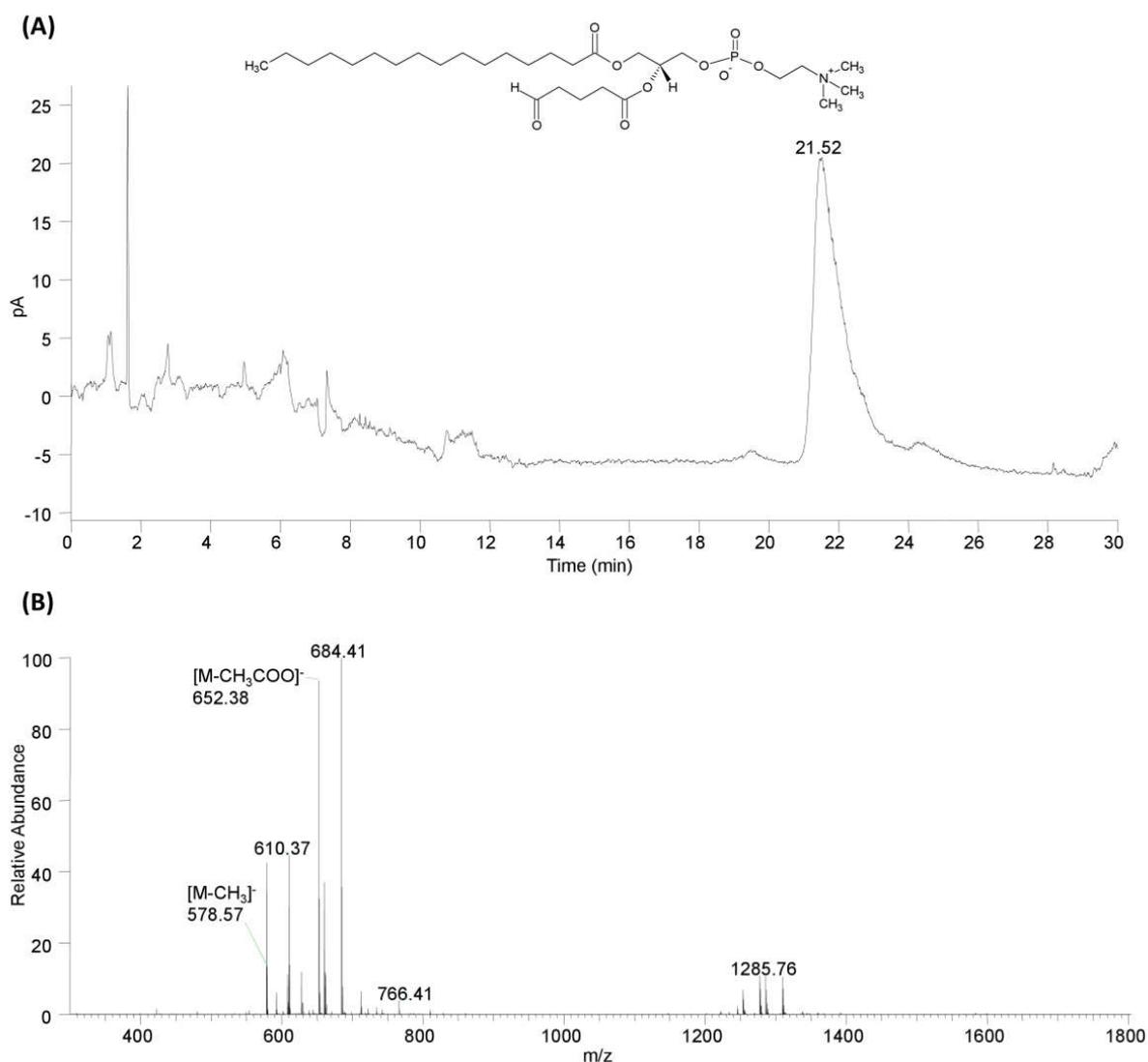
Les méthodes analytiques sont les mêmes que celles utilisées au chapitre 4 (paragraphe 2.5).

## 2.2 Résultats

### 2.2.1 Standards monomoléculaires

#### 2.2.1.1 Analyse du 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valéroyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine

Le POVPC est un PL oxydé (oxPL) appartenant à la classe II c'est-à-dire que ce produit d'oxydation des PC présente une chaîne d'AG qui a été rompue avec une fonction aldéhyde en position terminale. Sa structure et les résultats de son analyse sont présentés Figure 82. En détection Corona, on observe que son temps de rétention est de 21,5 minutes correspondant à la zone d'éluion des SM, Figure 82 (A). Son spectre de masse, Figure 82 (B), montre que cette molécule s'ionise sous forme d'adduits (adduit chloré pour  $m/z$  628,34 et acétique pour l'ion  $m/z$  652,38) et de son précurseur déméthylé  $m/z$  578,35. En revanche les  $m/z$  610,37 ; 660,36 et 684,41 sont des adduits non identifiés mais leur fragmentation montre qu'elle conduit soit à la formation du précurseur déméthylé ( $m/z$  610,37 et 660,36) soit de l'adduit acétique.



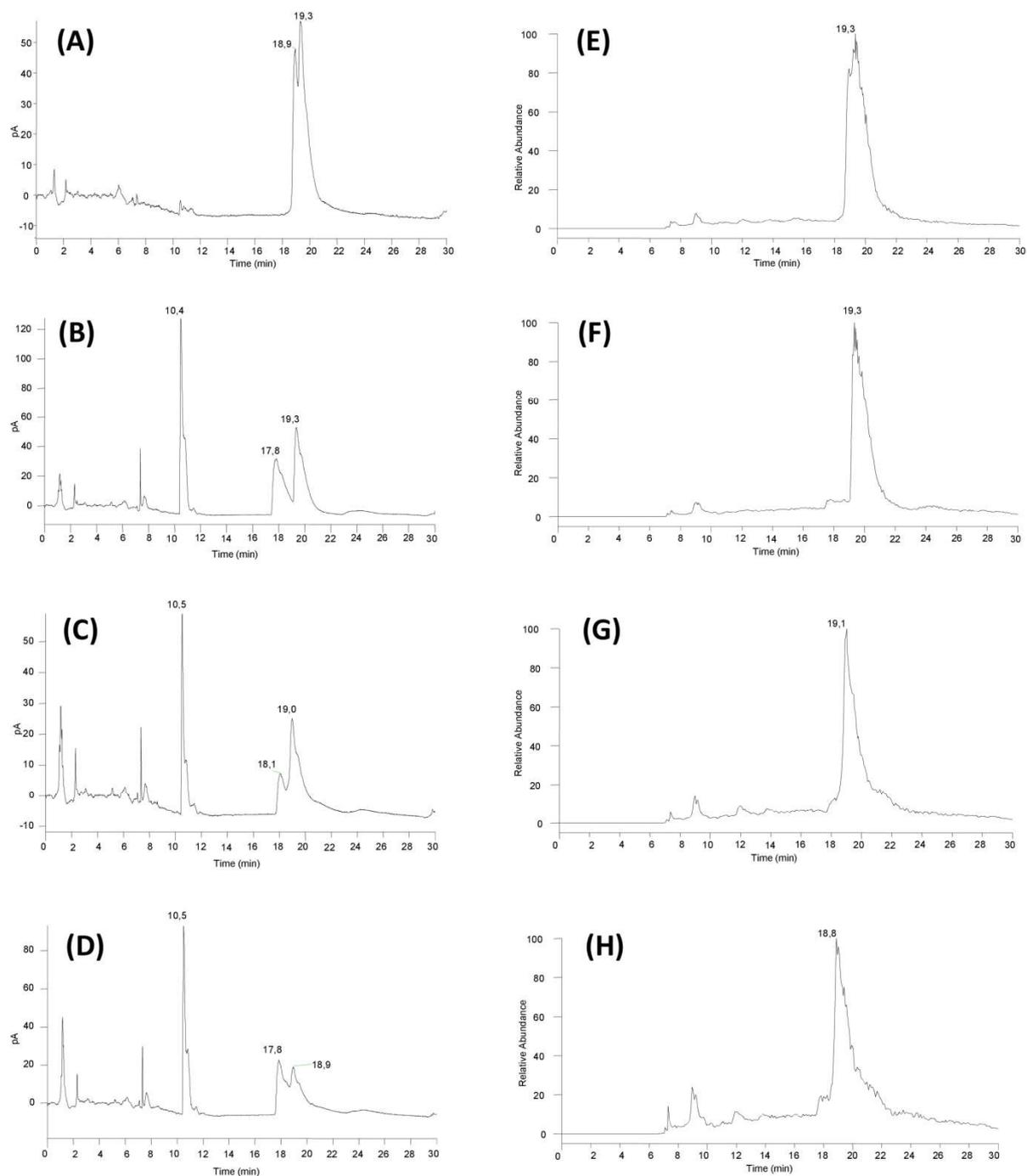
**Figure 82 : Chromatogramme du POVPC obtenu en détection Corona (A) et le spectre de masse correspondant (B)**

Ainsi les oxPC ayant subi une rupture de chaînes d'AG à la suite d'une oxydation, comme le POVPC, présentent une zone d'éluion ne correspondant pas aux PL natifs.

### **2.2.1.2 Analyses des produits d'oxydation de standards monomoléculaires comprenant deux acides gras polyinsaturés (AGPI)**

La réactivité des chaînes d'AG vis-à-vis des agents oxydants augmente avec le nombre d'insaturations. C'est pourquoi les trois standards monomoléculaires choisis présentent deux AGPI en position *sn1* et *sn2*. Les trois standards ont été analysés en mélange tandis que les échantillons issus de l'oxydation de l'AAPH ne contiennent qu'un seul PL natif avant réaction. Les chromatogrammes des quatre échantillons sont représentés Figure 83 en détection Corona et en courant ionique total.

On observe que les échantillons oxydés en détection Corona présentent deux pics chromatographiques supplémentaires, aux temps de rétention de 10,4 et 17,5 minutes. Ces pics ne sont pas retrouvés en observant le courant ionique total, il est fort probable que ces derniers correspondent à des impuretés non ionisables.



**Figure 83 : Profils chromatographiques d'un mélange équimoléculaire de PC (18:3/18:3) PC (20:4/20:4) et PC (22:6/22:6) observés en détection Corona (A) et en courant ionique total (E) et profils chromatographiques des échantillons obtenus après oxydation observés en détection Corona et en courant ionique total respectivement de PC (18:3/18:3) : (B et F) ; PC (20:4/20:4) : (C et G) et PC (22:6/22:6) : (D et H)**

Ainsi, l'observation des spectres de masse des échantillons a été réalisée sur les pics présentant une fenêtre d'élution entre 18 et 20 minutes.

La comparaison des spectres de masse des PL natifs et des échantillons oxydés montre que l'oxydation ne permet pas d'oxyder la totalité de l'échantillon. Cependant on observe des pics ayant

un  $m/z$  supérieur aux ions pseudo-moléculaires  $[M-CH_3COO]^-$  d'une intensité relative de l'ordre de 20 %. Ces ions correspondent à l'ajout de 32 unités de masse. De plus, le nombre de ces différents pics (ion moléculaire +  $(n \times 32)$ ) augmente avec le nombre d'insaturations portées par les AG (2 ions supplémentaires Figure 84 (B), 4 pour Figure 84 (C) et 6 Figure 84 (D)). Cette addition de 32 unités de masse peut correspondre à l'ajout de groupement hydroperoxyde. Ainsi les formes hydroperoxydes de PC présentent des temps de rétention semblables aux PC natives.

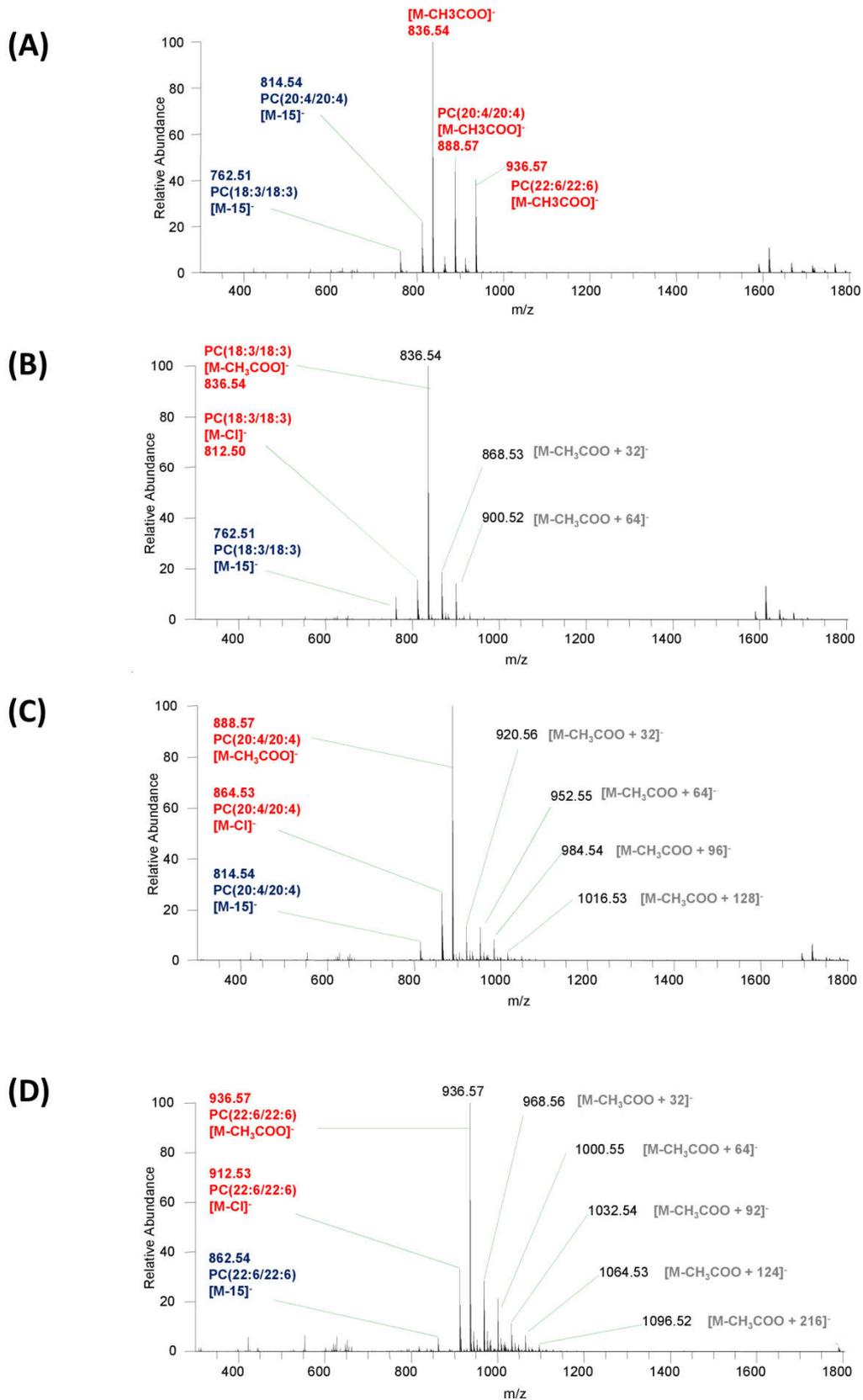
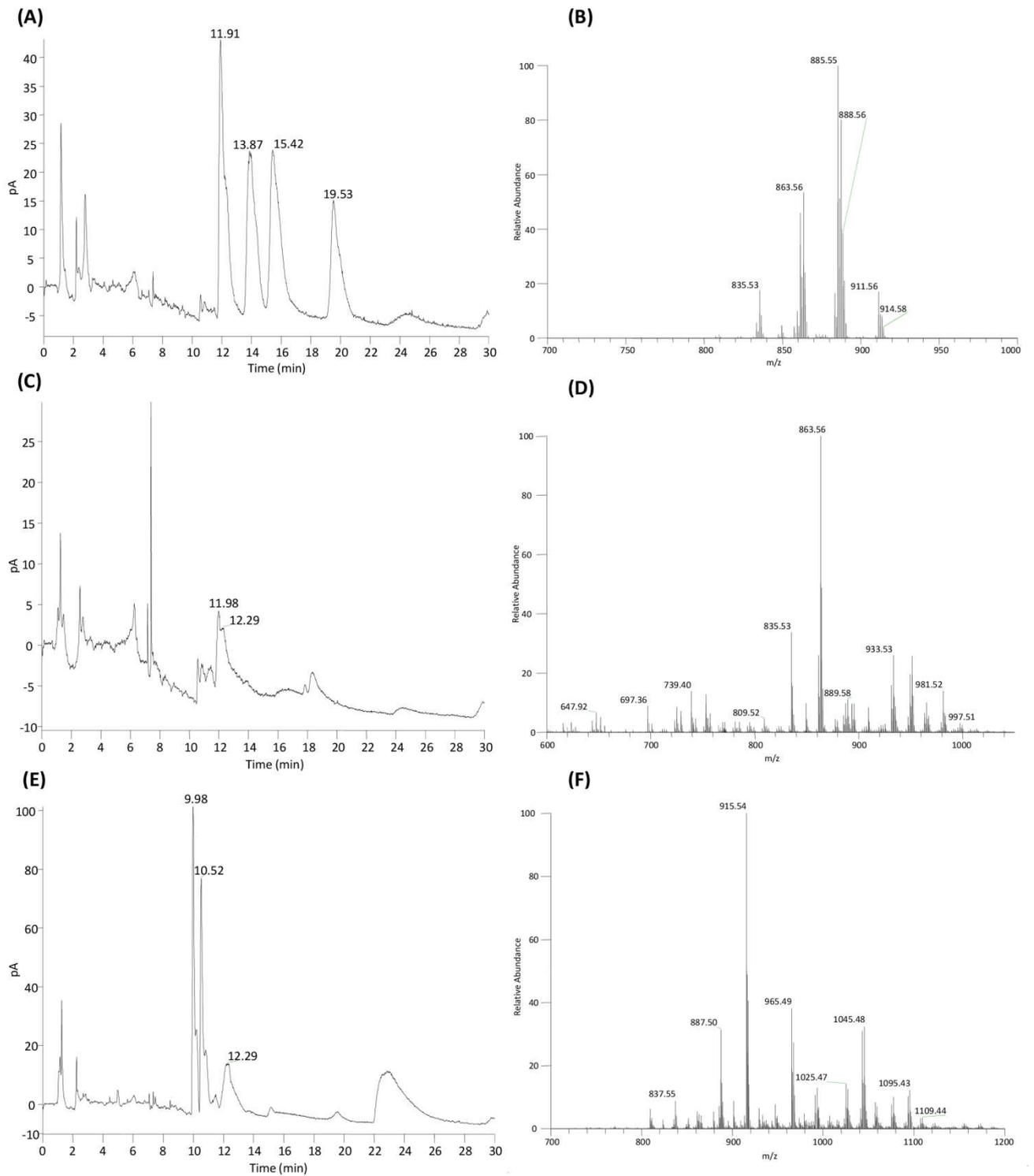


Figure 84 : Spectre de masse d'un mélange équimolaire de PC (18:3/18:3), PC (20:4/20:4) et PC (22:6/22:6) (A) ; spectre de masse des échantillons obtenus après oxydation de PC (18:3/18:3) : (B) ; PC (20:4/20:4) : (C) et PC (22:6/22:6) : (D)

## 2.2.2 Standards naturels

La Figure 85 (A) présente le chromatogramme d'un mélange de standards naturels de PL. La Figure 85 (B) représente le spectre de masse du standard de PI sans oxydation. Seuls les échantillons issus du standard de PI présentent des spectres de masse modifiés à la suite des oxydations effectuées. En effet, l'oxydation par l'AAPH et l'acide hypochloreux n'a pas eu d'effet sur les standards de PE, PS et PC utilisés dans ce cadre (Figure 86). Qualitativement, l'observation des différences des spectres de masse montre qu'il existe une modification significative des spectres obtenus après oxydation. Ces spectres sont observés pour les temps de rétention 11,98 Figure 85 (C) et 12,29 Figure 85 (D). De plus, on remarque que les ions formés sont significativement différents selon la méthode d'oxydation utilisée, Figure 85 (D et F).



**Figure 85 : Chromatogramme d'un mélange de phospholipides (A), spectre de masse correspondant aux PI natifs (B), chromatogramme d'un échantillon de PI oxydés obtenu avec l'AAPH (C), spectre de masse correspondant à la fenêtre d'élution 11,8-13 minutes (D), chromatogramme d'un échantillon de PI oxydés obtenu avec HOCl (E), spectre de masse correspondant à la fenêtre d'élution 11,8-13 minutes (F)**

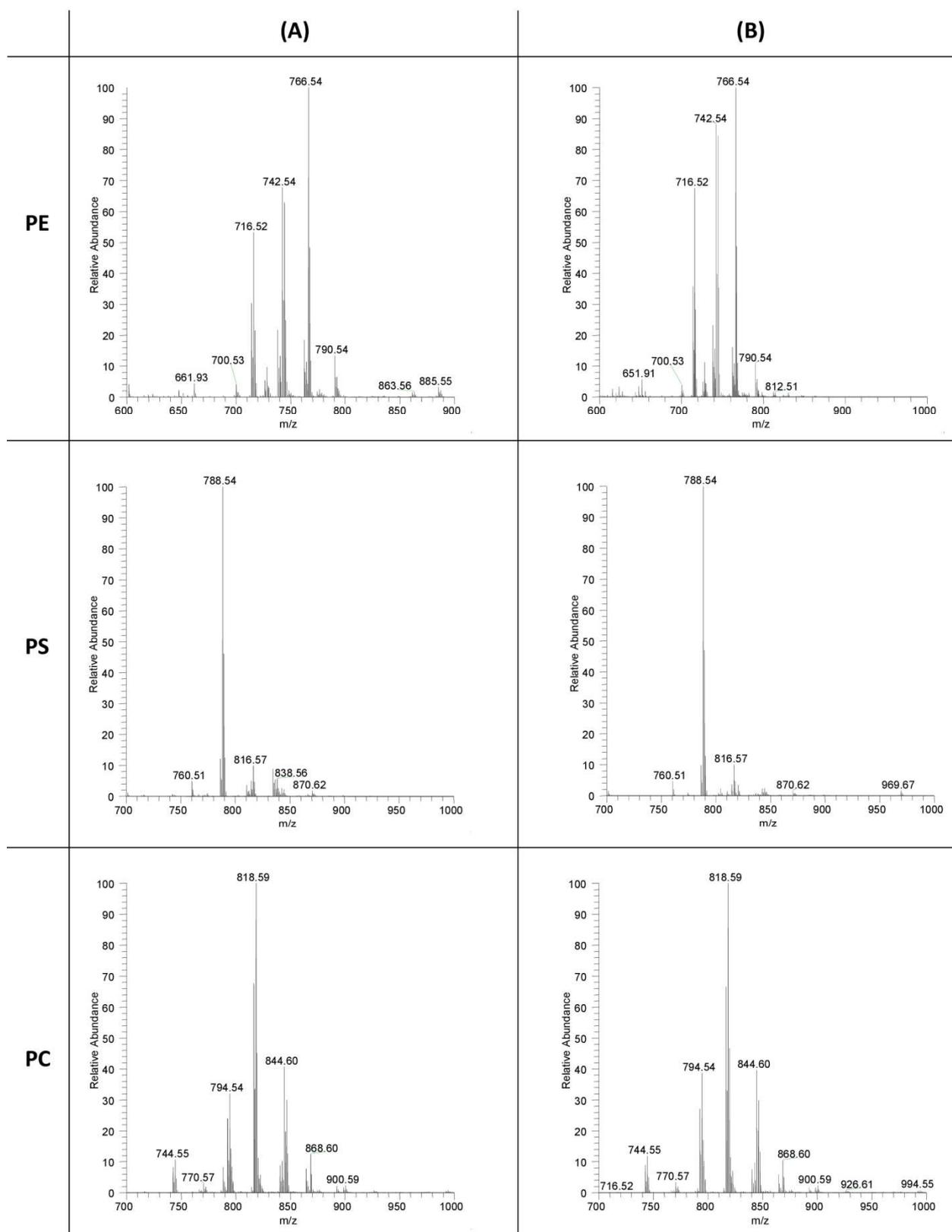


Figure 86 : Comparaison des spectres de masse des différentes classes de phospholipides avant oxydation (A) et après traitement à l'AAPH (B)

## 2.3 Conclusion

L'objectif de ce travail complémentaire est de proposer une stratégie analytique permettant de réaliser une analyse non ciblée des oxPL. Au regard de la complexité de l'analyse de ces composés et des acquis méthodologiques, une méthode de séparation à deux dimensions a été envisagée. La NP-LC pourrait être utilisée afin de collecter différentes fractions contenant des PL natifs et des oxPL. Au cours des études précédentes, ces dérivés oxydés n'ont jamais été mis en évidence avec ce mode de rétention, notamment à cause de la concentration des oxPL et du phénomène de suppression d'ionisation entre les différentes espèces moléculaires d'une même classe. Ainsi, à la suite de la collecte, une séparation en mode RP-LC pourrait être réalisée. Les deux méthodes sont par définition hors ligne à cause de l'incompatibilité des différents solvants entre NP-LC et RP-LC.

La démarche expérimentale réalisée est d'obtenir des données sur les propriétés de rétention des composés oxydés de PL sur support polyvinylalcool. Le POVPC est un des rares standards d'oxPL disponible commercialement et appartient à la classe II selon Davies. Le temps de rétention de cette espèce moléculaire ne correspond pas au temps de rétention d'un PC mais au pic des SM. Ainsi la rupture d'une chaîne d'AG modifie les propriétés de rétention des oxPL.

Par ailleurs, les méthodes de préparation des oxPL étant innombrables, nous avons décidé de choisir deux méthodes d'oxydation. L'utilisation de l'AAPH est reconnue pour être une méthode d'oxydation douce et dont les produits d'oxydation varient en fonction du temps de réaction et de la molarité de l'AAPH. Ainsi, il a été mis en évidence dans la littérature une grande variété de structure d'oxPL en utilisant cette méthode (hydroxy, céto, époxy et lysoPL). Dans cette étude les PC monomoléculaires comprenant 2 AGPI et le PI issu de foie de bovin montrent une modification des espèces moléculaires après oxydation, sans modification notable des temps de rétention associés, (temps de rétention comparable aux PC natifs). Les mêmes observations ont été réalisées sur les produits d'oxydation issus d'ajout d'acide hypochloreux sur des standards de PL naturels. Il s'agissait ici de vérifier si l'ajout d'un chlore sur les chaînes d'AG pouvait modifier les propriétés de rétention.

On peut donc affirmer que les modifications des propriétés de rétention des oxPL sur supports polyvinylalcool dépendent de la classe des produits d'oxydation. Il peut donc être envisagé de définir trois ou quatre fenêtres d'élution afin d'étudier ces fractions en RP-LC.

A l'évidence le développement d'une méthodologie d'analyse non ciblée des oxPL reste incomplet. Cependant, les différents travaux réalisés au cours de cette thèse pourraient ouvrir la voie vers le développement de cette thématique. En effet, la description de la majorité des espèces

moléculaires de PL de différents types de macrophages permet de connaître précisément la composition de ces extraits biologiques. Ainsi, il pourrait être envisagé d'utiliser les PL de macrophages issus de lignée à la place de standards commerciaux. Ces échantillons présentent l'avantage d'être peu coûteux et en quantité illimitée. De plus, la méthode de séparation des différentes catégories de lipides pourrait être effectuée en utilisant la méthode SPE présentée au cours du chapitre 4 (séparation lipides neutres et PL). A partir de cette fraction phospholipidique, les différentes classes pourraient être collectées en utilisant la méthode de séparation des PL en NP-LC. Ainsi, la méthode de séparation des PL sur support polyvinylalcool représente la méthode centrale pour développer l'analyse non ciblée des oxPL. Elle servirait non seulement de première dimension d'une méthode de chromatographie mais aussi à préparer des échantillons de PL natifs destinés à être oxydés. Cette stratégie analytique devra être complétée en étudiant les différentes méthodes d'oxydation. En effet, les protocoles d'oxydation choisis peuvent produire des dérivés oxydés sur des PL présentant des AGPI. En revanche, pour les AGMI des méthodes d'oxydation plus dures doivent être envisagées comme par exemple l'eau oxygénée avec des métaux de transition.



# **Conclusion générale**

L'objectif initial de ce travail était d'apporter l'éclairage de la lipidomique sur la thématique de l'équipe de biologie.

Ce travail de thèse a débuté par l'étude de l'impact des paramètres de prétraitement sur les résultats des analyses discriminantes. Cette étape est effectivement critique puisque la matrice résultante doit être représentative des données sans contenir d'information non pertinente. Les résultats ont montré que les paramètres de prétraitement doivent être réglés conformément aux caractéristiques du système analytique utilisé et aux observations réalisées concernant les données brutes. Par ailleurs les modifications apportées par l'addition chronique d'AG  $\omega$ 3 dans des cultures cellulaires de macrophages J774 ont été explorées. Il a été observé que cet AG est intégré et métabolisé parmi les PL membranaires. Cet apport modifie considérablement les profils phospholipidiques notamment par la surexpression du PI (18:0/22:5) dans le groupe de cellules EPA. Néanmoins l'utilisation d'un spectromètre triple quadripolaire limite les capacités d'identification des PL et nécessite une quantité d'échantillons importante.

C'est pourquoi les travaux ont été poursuivis avec un spectromètre de masse hybride permettant de concilier les avantages de la détection ultra-haute résolution et les exigences d'identification des métabolites. Avec ce système, une cartographie de la composition des PL de différents types de macrophages a été réalisée afin de définir les différences et les points communs entre ces cellules afin de pouvoir substituer l'utilisation des macrophages humains lors d'études ultérieures. Il s'agissait de compléter les résultats des analyses discriminantes en ayant un regard sur les espèces moléculaires qui ne sont pas modifiées par le stimulus apporté. La caractéristique des macrophages humains se situe au niveau de la quantité d'AGPI. Pour les macrophages issus de lignée, il a pu être observé que près de 70 % du lipidome identifié est commun au THP1 et au J774. Ainsi, il est délicat de recommander la substitution des macrophages humains par des cellules issues de lignées, dans le contexte d'une analyse non ciblée des PL. En revanche, si l'étude porte sur une classe particulière de PL, cette cartographie peut servir d'argument objectif afin de rationaliser l'emploi des lignées cellulaires.

Ce travail s'est poursuivi en étudiant l'impact de l'incorporation de l'EPA sur les profils phospholipidiques de macrophages humains. Il a été montré que la répartition des différentes classes phospholipidiques n'était pas influencée par l'enrichissement chronique en EPA des cultures de macrophages humains. Au contraire, d'importantes modifications ont été observées concernant les PL membranaires. Ces modifications de profils phospholipidiques ont été reliées à la fonction biologique étudiée : l'efflux du cholestérol ABCA1 dépendant. Principalement deux espèces moléculaires ont pu être mises en avant, appartenant à la classe des PI et PS.

Enfin, le même type d'étude a été réalisé concernant les macrophages surchargés en cholestérol qui miment les cellules spumeuses retrouvées dans les plaques d'athérosclérose. Nous avons pu montrer que peu de modifications des PL membranaires sont induites par la surcharge des macrophages avec des LDL acétylées. Par ailleurs, si les cellules sont surchargées en cholestérol en présence d'EPA, les modifications des profils phospholipidiques sont très similaires à ceux décrits pour les macrophages non surchargés. Enfin, les relations entre les modifications de profils phospholipidiques et la diminution d'efflux du cholestérol n'ont pas pu être établies montrant ainsi que les mécanismes entre les deux modèles (surchargés et non surchargés) sont sans doute différents. Une étude d'identification des mécanismes biochimiques a donc été menée. Les mécanismes de l'altération du fonctionnement de l'ABCA1 en présence d'EPA sont effectivement très différents chez les cellules surchargées. En effet, pour les cellules au contenu normal en cholestérol le mécanisme de la diminution de l'efflux est principalement membranaire, tandis que pour les cellules spumeuses cette diminution peut être expliquée par une altération de la mobilisation intracellulaire du cholestérol libre à partir des gouttelettes lipidiques d'esters de cholestérol qui caractérisent ces cellules.

Les résultats obtenus ont montré la nécessité de renforcer la démarche interdisciplinaire entreprise au sein du laboratoire Lip(sys)<sup>2</sup>. En effet, le développement d'une méthodologie d'analyse non ciblée des espèces moléculaires de phosphoinositides serait particulièrement intéressant. Puisque la modification de la composition des phosphoinositides et/ou des phosphatidylinositols pourrait expliquer les modifications de l'efflux du cholestérol ABCA1 dépendant observées dans les cellules non surchargées en cholestérol. Par ailleurs, les résultats du profilage des PL membranaires des macrophages spumeux ont montré que le versant membranaire, bien que modifié, ne pouvait à lui seul expliquer l'altération du fonctionnement de l'ABCA1. Une étude de la modification de la composition des gouttelettes lipidiques au sein de ces macrophages pourrait ouvrir une nouvelle voie vers la compréhension de ces phénomènes. Le profilage des espèces moléculaires d'ester de cholestérol et de triglycérides constitue une perspective prometteuse. Par ailleurs, on peut supposer qu'une modélisation de l'efflux du cholestérol pourrait être réalisable en utilisant les résultats de la lipidomique des lipides neutres.

En conclusion, une étude lipidomique des macrophages a été l'occasion de décrire le lipidome de différents types cellulaires et d'expliquer en partie les mécanismes de diminution du cholestérol provoquée par l'ajout chronique d'EPA. Ce travail de thèse aura permis au regard des résultats d'ouvrir la voie vers des études complémentaires. Ceci s'exprime particulièrement dans le cadre de l'analyse des eicosanoïdes et des phospholipides oxydés. Le développement de l'analyse de « l'oxylipidome » est soumis aux avancées techniques et méthodologiques de la chimie analytique. Mais ils représentent une thématique pouvant ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension

des phénomènes inflammatoires observés dans des maladies à forte incidence et éventuellement découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

# **Annexes**

# 1 Annexes 1 : Composition des macrophages de Souris J774

## 1.1 Etude des phosphatidylcholines

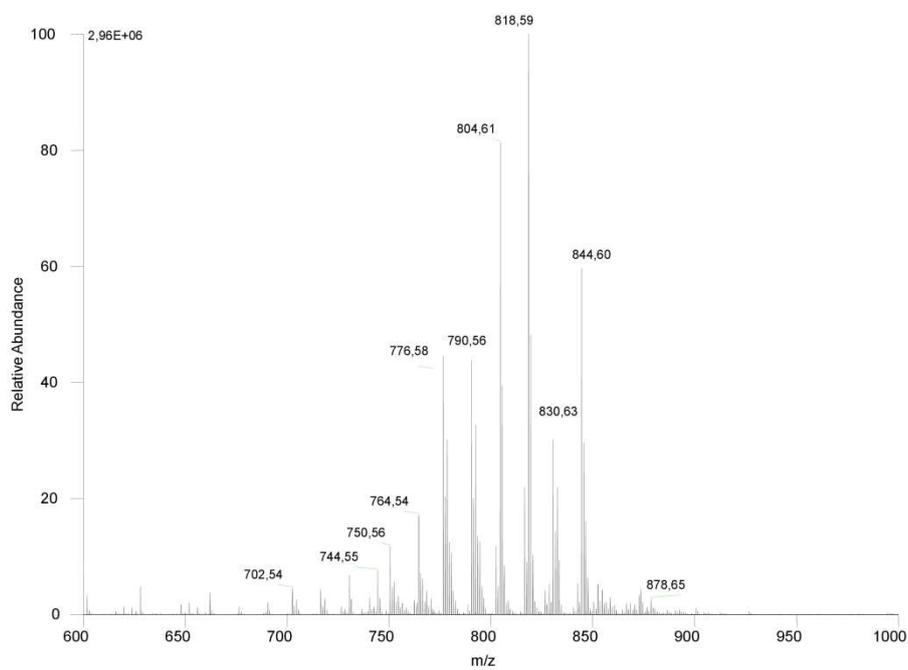


Figure 87 : Spectre de masse des phosphatidylcholines de macrophages J774

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
818,59	PC (16:0/18:1)	100	
804,61	PC (O-16:0/18:1) PC (P-18:0/16:0)	88,86	11,18
844,60	PC (18:1/18:1)	60,45	1,69
776,58	PC (O-16:0/16:1) PC (P-16:0/16:0) PC (P-18:0/14:0)	54,01	12,23
790,56	PC (16:0/16:1) PC (14:0/18:1)	42,40	1,52
778,59	PC (O-16:0/16:0) PC (O-18:0/14:0)	40,02	12,32
792,57	PC (16:0/16:0)	32,92	0,44
830,63	PC (P-18:0/18:1) PC (O-16:0/20:2)	31,28	4,11
816,57	PC (16:1/18:1) PC (16:0/18:2)	22,66	1,80
832,64	PC (O-18:0/18:1) PC (O-16:0/20:1)	19,43	0,71
764,54	PC (14:0/16:0)	15,31	3,07
802,59	PC (P-18:0/16:1) PC (O-16:0/18:2) PC (P-16:0/18:1)	14,23	3,37
846,62	PC (18:0/18:1) PC (16:0/20:1)	13,51	1,45
820,6	PC (16:0/18:0)	12,88	4,56
750,56	PC (O-16:0/14:0)	12,75	1,45
806,58	PC (O-16:0/18:0) PC (O-18:0/16:0)	7,94	4,13
852,61	PC (P-18:0/20:4) PC (O-16:0/22:5)	6,89	2,63
828,61	PC (P-18:0/20:4) PC (O-16:0/22:5)	6,13	1,48
826,59	PC (O-16:0/20:4)	6,02	2,57
850,59	PC (P-18:0/20:5) PC (O-16:0/22:6)	5,24	2,21
854,62	PC (O-18:0/20:4) PC (O-16:0/22:4) PC (P-18:0/20:3)	4,96	1,26
880,64	PC (O-18:0/22:5) PC (P-18:0/22:4)	2,64	0,03
858,65	PC (P-18:0/20:1) PC (P-20:0/18:1) PC (O-18:0/20:2) PC (O-16:0/22:2)	2,61	0,06
856,64	PC (O-18:0/20:3) PC (P-18:0/20:2) PC (O16:0/22:3)	2,15	0,22
878,62	PC (P-18:0/22:5) PC (O-18:0/22:6)*	2,15	0,22
882,65	PC (O-18:0/22:4) PC (P-18:0/22:3) PC (O-20:0/20:4) PC (P-20:0/20:3)	1,68	0,69
876,61	PC (P-18:0/22:6)	1,40	0,48

Tableau 29 : Identification des ions de phosphatidylcholines de macrophages J774

## 1.2 Etude des phosphatidyléthanolamines

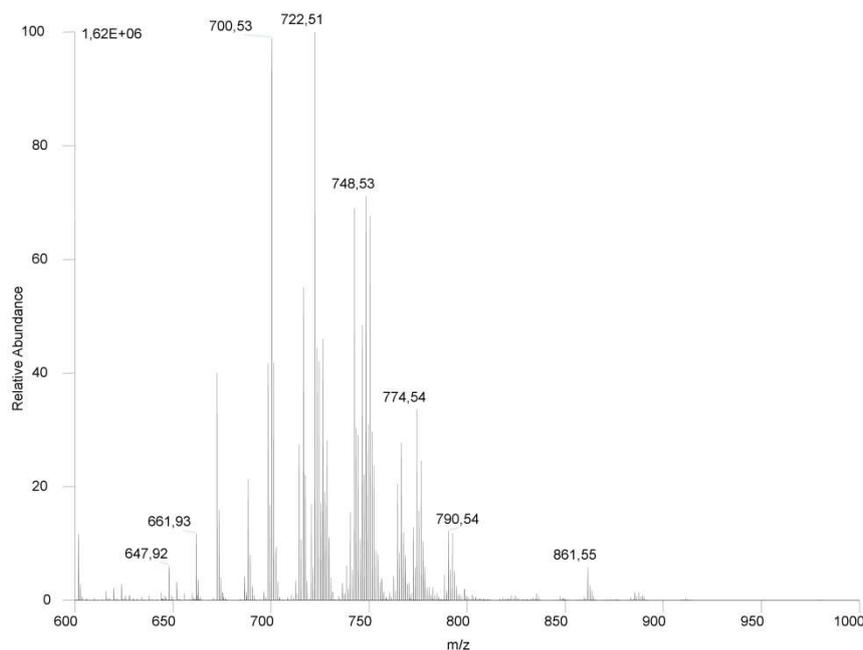


Figure 88 : Spectre de masse des phosphatidylethanolamines de macrophages J774

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
700,53	PE (P-16:0/18:1) PE (P-18:0/16:1)	100	
722,51	PE (P-16:0/20:4) PE (O-16:0/20:5)	85,69	16,61
748,53	PE (O-18:2/20:4) PE (P-16:0/22:5) PE (O-16:0/22:6) PE (P-18:0/20:5)	70,48	4,71
742,54	PE (18:1/18:1) PE (18:0/18:2)	59,55	11,0
746,64	PE (P-16:0/22:6) PE (O-18:2/20:5)	48,83	3,26
716,52	PE (16:0/18:1) PE (16:1/18:0)	48,19	11,67
726,54	PE (O-18:2/18:1) PE (P-18:0/18:2) PE(P-16:0/20:2)	39,66	7,87
698,51	PE (O-18:2/16:1) PE (P-16:0/18:2)	36,58	8,88
724,53	PE (P-16:0/20:3) PE (O-18:2/18:2) PE (O-16:0/20:4)	36,32	6,71
672,50	PE (P-16:0/16:1)	34,86	9,28
774,56	PE (P-18:0/22:6) PE (O-18:2/22:5)	32,33	0,66
714,51	PE (16:1/18:1)	30,03	4,99
766,54	PE (18:0/20:4)	26,87	1,76
744,55	PE (18:0/18:1)	24,92	4,92
728,56	PE (P-16:0/20:1) PE (P-18:0/18:1)	23,86	4,95
776,55	PE (P-18:0/22:5) PE (O-18:2/22:4) PE (O-18:0/22:6)	22,69	0,71

Tableau 30 : Identification des ions de phosphatidylethanolamines de macrophages J774

### 1.3 Etude des phosphatidylsérines

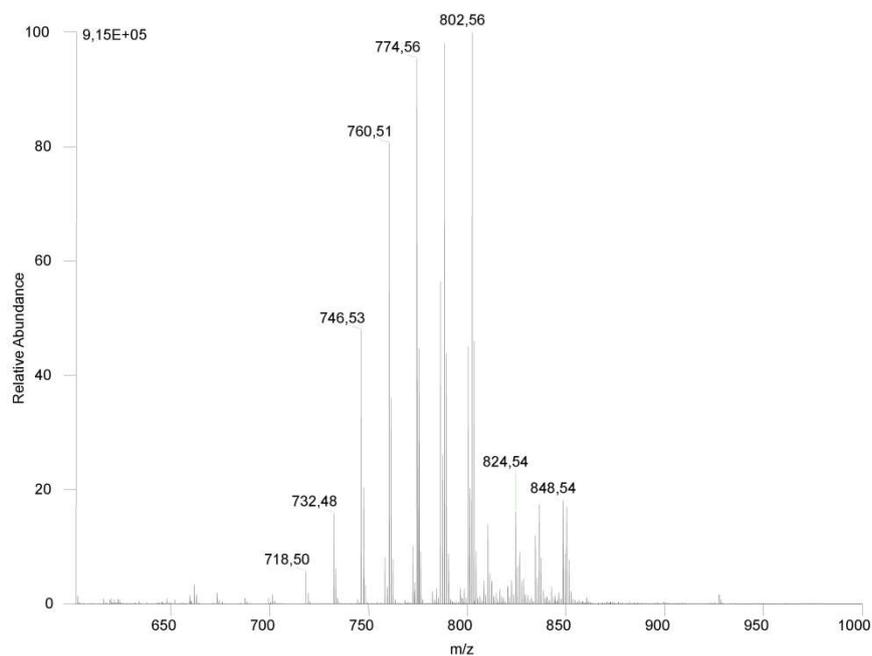


Figure 89 : Spectre de masse des phosphatidylsérines de macrophages J774

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
788,54	PS (18:0/18:1)	100	
760,51	PS (16:/18:1) PS (16:1/18:0)	80,21	22,42
786,53	PS (18:1/18:1) PS (18:0/18:2)	60,14	16,66
812,54	PS (18:2/20:1)	35,88	11,35
814,56	PS (18:0/18:1)	32,50	6,67
836,54	PS (18:0/22:5)	23,97	2,38
758,5	PS (16:0/18:2) PS (16:1/18:1)	18,61	1,59
732,48	PS (16:1/16:0)	18,14	3,94
810,53	PS (18:0/20:4) PS (18:1/20:3)	16,34	3,26
834,53	PS (18:0/22:6)	14,96	2,94
790,55	PS (18:0/18:0)	8,70	1,17

Tableau 31 : Identification des ions de phosphatidylsérines de macrophages J774

## 1.4 Etude des phosphatidylinositols

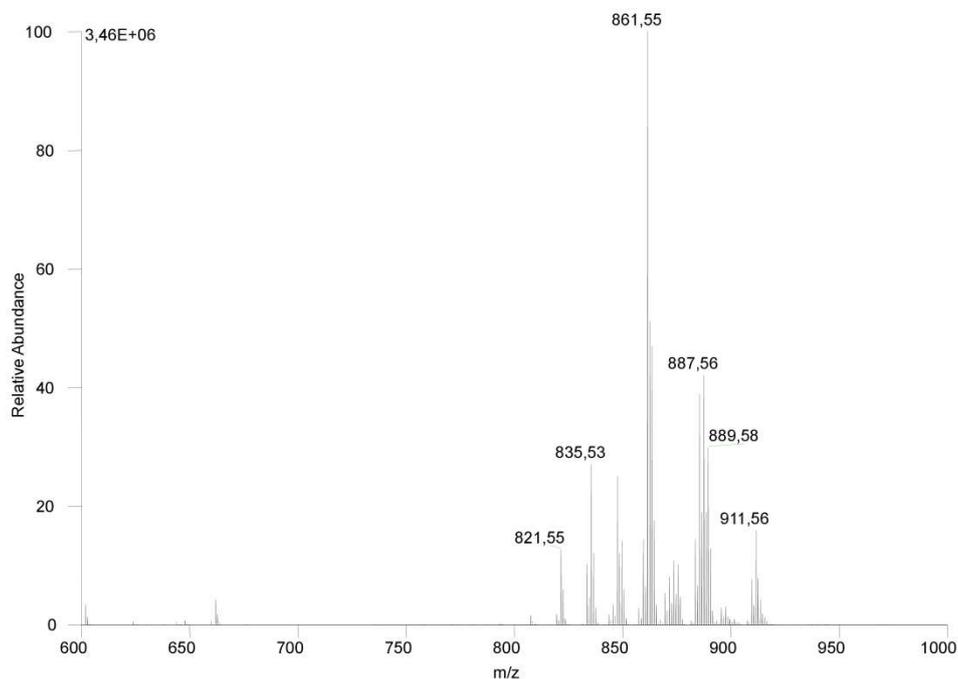


Figure 90 : Spectre de masse des phosphatidylinositols de macrophages J774

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
861,55	PI (18:1/18:1) PI (18:0/18:2)	100	
863,56	PI (18:0/18:1)	54,37	9,24
885,55	PI (18:0/20:4)	51,19	16,67
887,56	PI (18:0/20:3)	48,20	9,77
889,58	PI (18:0/20:2) PI (18:1/20:1)	27,80	0,27
847,57	PI (P-18:0/18:1) PI (O-16:0/20:2)	26,12	2,56
835,53	PI (16:0/18:1)	23,78	3,33
883,53	PI (18:1/20:4)	16,28	2,73
911,56	PI (18:0/22:5)	15,99	1,53
821,53	PI (O-16:0/18:1)	12,53	1,01
849,58	PI (O-18:0/18:1)	12,47	0,75
873,58	PI (P-18:0/20:2) PI (O-18:0/20:3)	11,02	1,79
859,53	PI (16:0/20:3) PI (18:1/18:2)	10,61	6,38
871,57	PI (O-18:0/20:4)	9,66	2,61
833,52	PI (16:1/18:1) PI (16:0/18:2)	9,32	0,97
875,6	PI (O-18:0/20:2)	8,87	0,55
869,55	PI (O-16:0/22:5) PI (P-18:0/20:4)	6,72	2,14
865,57	PI(18:0/18:1)	4,56	1,35
897,58	PI (O-18:0/22:5) PI (P-18:0/22:4)	2,94	0,24
857,52	PI (16:0/20:4)	2,90	0,09
843,54	PI (O-16:0/20:4)	2,45	0,94
837,54	PI (16:0/18 :0)	2,45	0,53

Tableau 32 : Identification des ions de phosphatidylinositols de macrophages J774

## 1.5 Etude des cardiolipines

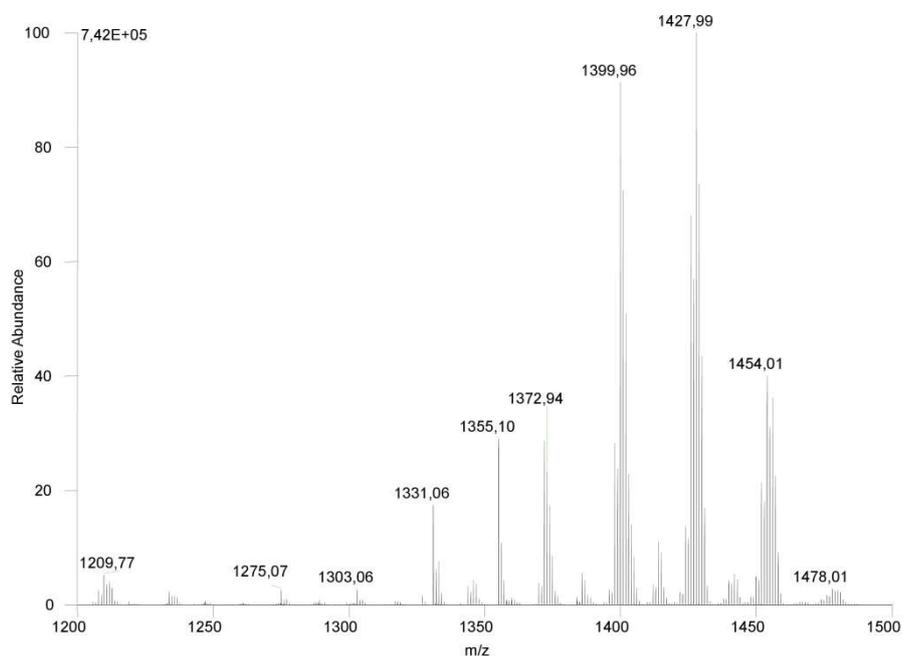


Figure 91 : Spectre de masse des cardiolipines de macrophages J774

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
1427,99	CL (16:1/18:1_18:1/18:1)	100	
1399,96	CL (16:1/18:1)_(16:1/18:1)	82,02	14,93
1425,98	CL (16:1/18:1_18:1/18:2)	81,59	10,99
1454,01	CL (18:1/18:2_18:1/18:1)	53,82	10,25
1430	CL (16:0/18:1_18:1/18:1)	46,64	1,66
	CL (16:1/18:0_18:1/18:1)		
1401,98	CL (16:1/18:1)_(16:0/18:1)	44,15	6,02
	CL (16:1/18:1_16:1/18:0)		
1456,02	CL (18:1/18:1_18:1/18:1)	39,38	0,92
1451,99	CL (18:1/18:2_18:1/18:2)	34,85	11,32
1397,95	CL(16:1/18:2_16:1/18:1)	32,12	9,83
	CL (16:1/16:1)_18:1/18:2		
1371,93	CL (16:1/16:1)_(16:1/18:1))	26,77	1,66
	CL (14:0/18:2)_(16:1/18:1))		
1478,01	CL (18:1/18:2_18:1/20:3)	3,89	1,34

Tableau 33 : Identification des ions de cardiolipines de macrophages J774

## 1.6 Etude des phosphatidylglycerols

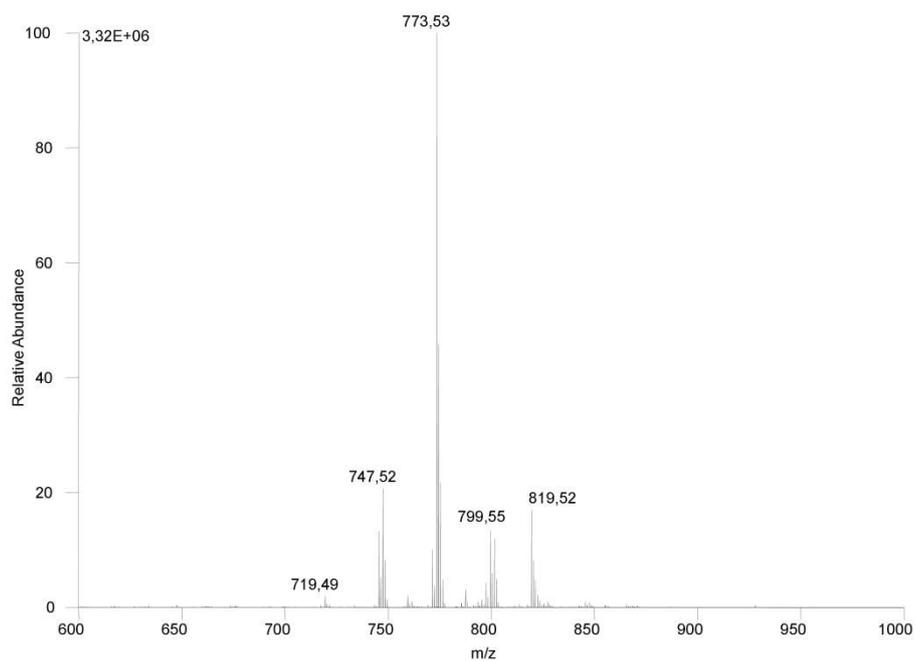


Figure 92 : Spectre de masse des phosphatidylglycerols de macrophages J774

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
773,53	PG (18:1/18:1)	100	
775,54	PG (18:0/18:1)	17,99	5,94
747,51	PG (16:0/18:1) PG (16:1/18:0)	16,62	5,28
819,59	PG (18:1/22:6)	16,32	4,21
799,55	PG (18:1/20:2)	13,59	0,32
745,56	PG (16:1/18:1)	13,45	0,26
771,52	PG (18:1/18:2)	11,70	2,69
801,55	PG (18:1/20:1)	5,54	2,81
749,53	PG (16:0/18:0)	1,14	0,63
719,49	PG (16:0/16:1)	1,11	0,76

Tableau 34 : Identification des ions de phosphatidylglycerols de macrophages J774

## 1.7 Etude des sphingomyélines

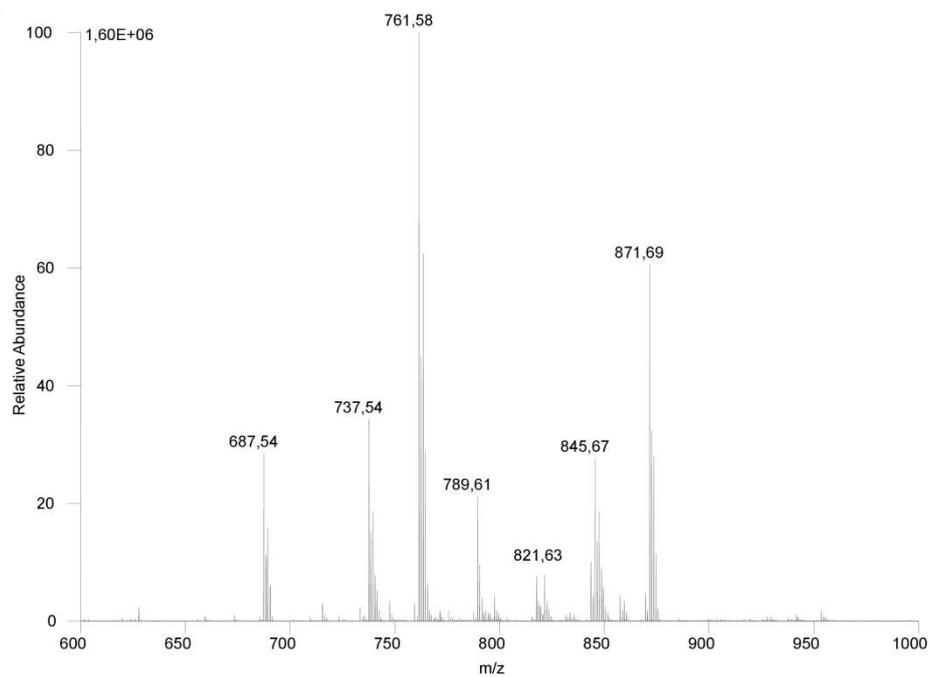


Figure 93 : Spectre de masse des sphingomyélines de macrophages J774

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
761,58	SM (d18:1/16:0)	100	13,75
763,60	SM (d18:0/16:0)	56,47	2,74
871,57	SM (d18:1/24:1)	53,23	4,37
873,70	SM (d18:1/24:0)	26,65	0,87
845,64	SM (d18:1/22:0)	25,48	0,87
789,61	SM (d18:1/18:0)	18,48	1,98

Tableau 35 : Identification des ions de sphingomyélines de macrophages J774

## 2 Annexe 2 : Composition des macrophages THP1

### 2.1 Etude des phosphatidylcholines

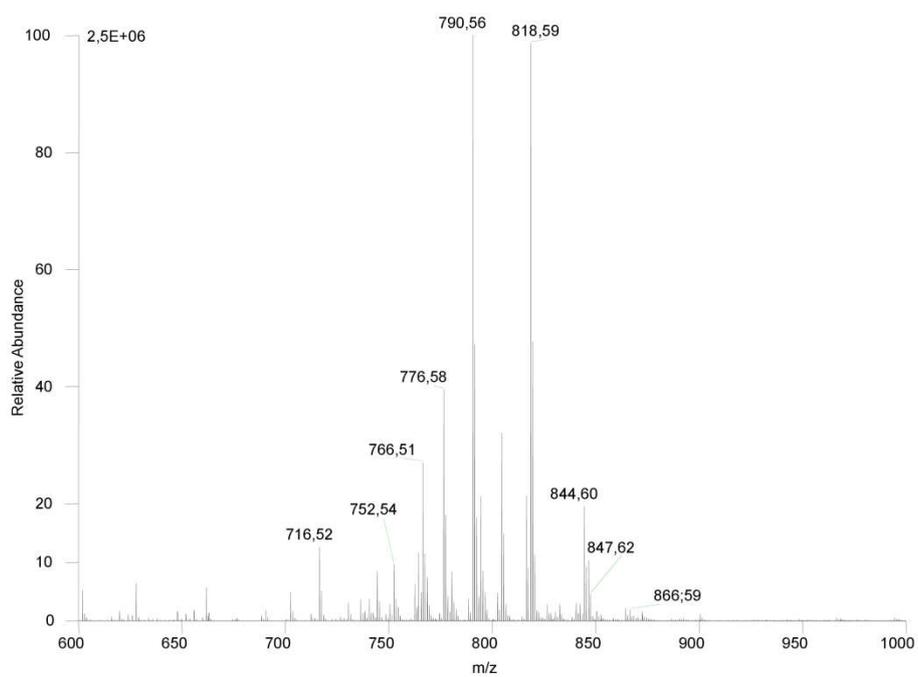


Figure 94 : Spectre de masse des phosphatidylcholines de macrophages THP1

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
818,59	PC (16:0/18:1) PC (16:1/18:0)	100	
790,56	PC (16:0/16:1)	94,19	5,34
776,56	PC (O-16:0/16:1)	32,89	3,19
804,61	PC (O-16:0/18:1) PC (O-18:0/16:1)	30,15	1,30
816,57	PC (16:1/18:1) PC (16:0/18:2)	21,19	0,52
844,6	PC (18:1/18:1)	19,96	1,19
792,57	PC (16:0/16:0)	15,36	1,88
764,54	PC (14:0/16:0)	13,58	1,21
820,60	PC (16:0/18:0)	11,16	0,24
846,62	PC (18:0/18:1)	10,47	0,40
762,58	PC (14:0/16:1) PC (14:1/16:0)	10,11	4,14
780,57	PC (O-16:0/18:1) PC (O-18:0/16:1)	8,71	0,34
802,59	PC (P-16:0/18:1) PC (P-18:0/16:1)	4,82	0,16
736,51	PC (14:0/14:0)	4,04	0,39
778,57	PC (O-16:0/16:0)	3,97	1,04
826,59	PC (O-16:0/20:4)	3,13	0,18
832,64	PC (O-16:0/20:1) PC (O-18:0/18:1)	2,16	0,65
874,65	PC (16:0/22:1) PC (18:1/20:0) PC (18:0/20:1)	2,04	0,49
850,6	PC (O-16:0/22:6) PC (P-18:0/20:5)	1,93	0,30
852,61	PC (P-18:0/20:4) PC (O-16:0/22:5)	1,56	0,31
876,61	PC (P-18:0/22:6)	1,56	0,31
828,56	PC (O-16:0/20:3)	1,29	0,57
854,63	PC (O-18:0/20:4) PC (O-16:0/22:4) PC (P-18:0/20:3)	0,32	0,09
878,62	PC (O-18:0/22:6) PC (P-18:0/22:5)	0,32	0,09

Tableau 36 : Identification des ions de phosphatidylcholines de macrophages THP1

## 2.2 Etude des phosphatidyléthanolamines

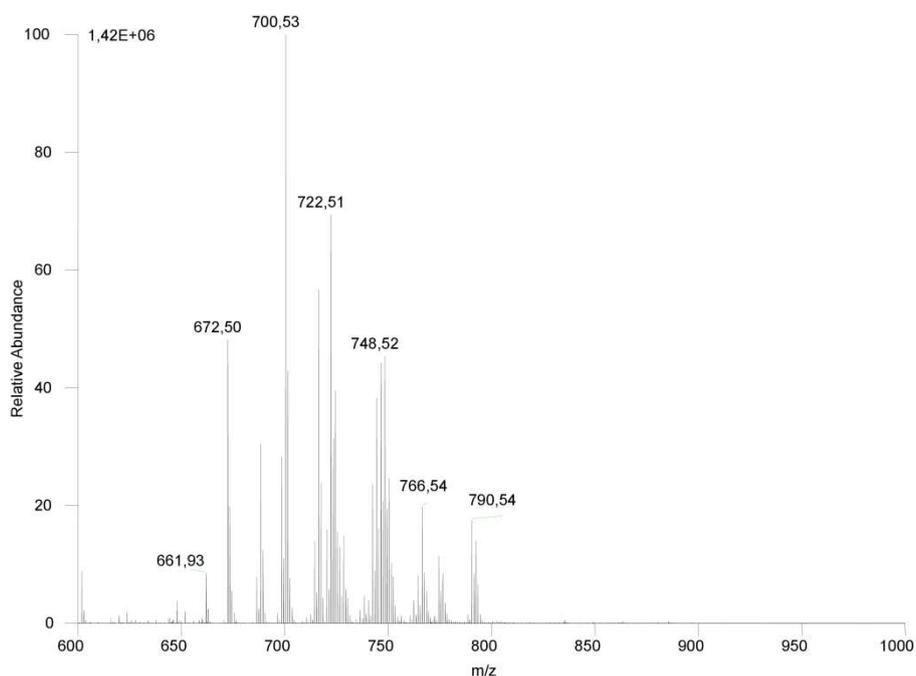


Figure 95 : Spectre de masse des phosphatidylethanolamines de macrophages THP1

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
700,53	PE (P-16:0/18:1)	100	
722,51	PE (P-16:0/20:4) PE (O-16:0/20:5)	75,64	12,12
716,52	PE (16:0/18:1) PE (16:1/18:0)	61,92	7,29
748,53	PE (P-16:0/22:5) PE (P-18:0/20:5) PE (O-18:2/20:4)	53,33	7,17
746,51	PE (P-16:0/22:6)	51,73	8,37
672,5	PE (P-16:0/16:1)	49,16	4,09
744,55	PE (18:0/18:1)	43,44	7,94
724,53	PE (P-16:0/20:3) PE (O-16:0/20:4)	43,03	1,95
688,49	PE (16:0/16:1)	36,31	1,22
750,54	PE (P-18:0/20:4) PE (O-16:0/22:5) PE (O-18:0/20:5)	34,64	3,59
698,51	PE (P-16:0/18:2)	28,18	0,29
790,54	PE (18:0/22:6) PE (18:1/22:5)	27,03	9,17
742,54	PE (18:1/18:1) PE (18:0/18:2)	26,07	3,91
792,55	PE (18:0/22:5)	19,41	4,79
720,50	PE (P-16:0/20:5)	18,68	2,99
774,54	PE (P-18:0/22:6)	18,35	1,64
728,56	PE (P-18:0/18:1)	15,84	1,98
714,51	PE (16:1/18:1) PE (16:0/18:2)	15,77	1,18
776,56	PE (O-18:0/22:6) PE (P-18:0/22:5)	14,38	1,00
752,56	PE (O-18:0/20:4) PE (P-18:0/20:3)	13,59	0,31
718,53	PE (16:1/18:0) PE (16:0/18:1)	4,61	0,31
778,57	PE (O-18:0/22:5) PE (P-20:0/20:4) PE (P-18:0/22:4)	4,18	0,26

Tableau 37 : Identification des ions de phosphatidylethanolamines de macrophages THP1

## 2.3 Etude des phosphatidylsérines

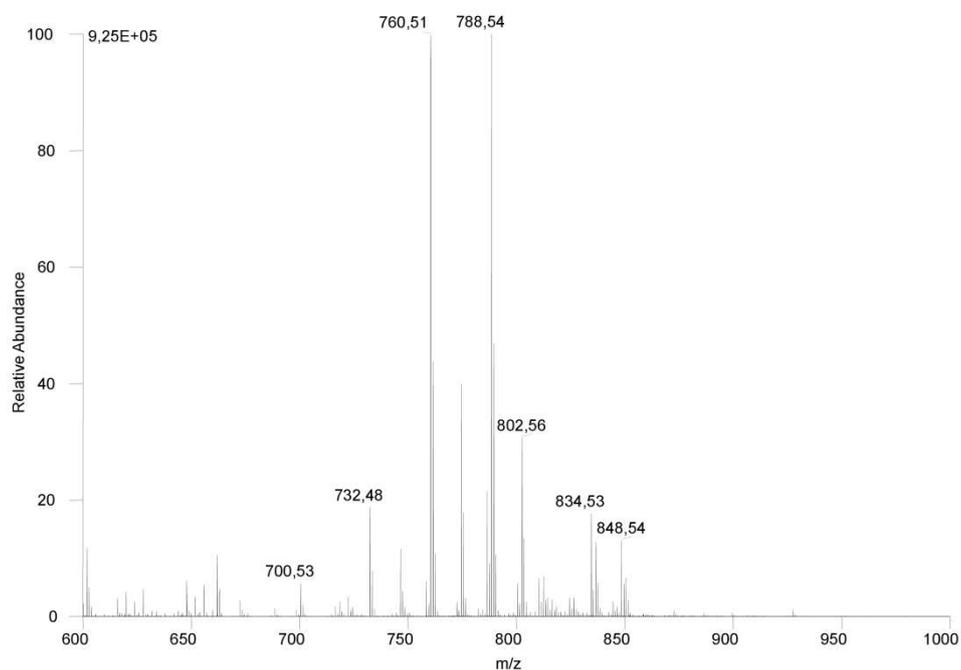


Figure 96 : Spectre de masse des phosphatidylsérines de macrophages THP1

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
788,54	PS (18:0/18:1)	100	
760,51	PS (16:0/18:1) PS (16:1/18:0)	90,56	6,80
786,53	PS (18:1/18:1)	25,84	7,11
836,54	PS (18:0/22:5)	17,45	6,14
732,48	PS (16:0/16:1)	17,08	3,35
834,53	PS (18:0/22:6) PS (18:1/22:5)	16,64	6,59
790,55	PS (18:0/18:0)	10,19	0,55
762,52	PS (16:0/18:0)	9,09	0,93
758,58	PS (16:1/18:1) PS (16:0/18:2)	8,02	3,35

Tableau 38 : Identification des ions de phosphatidylsérines de macrophages THP1

## 2.4 Etude phosphatidylinositols

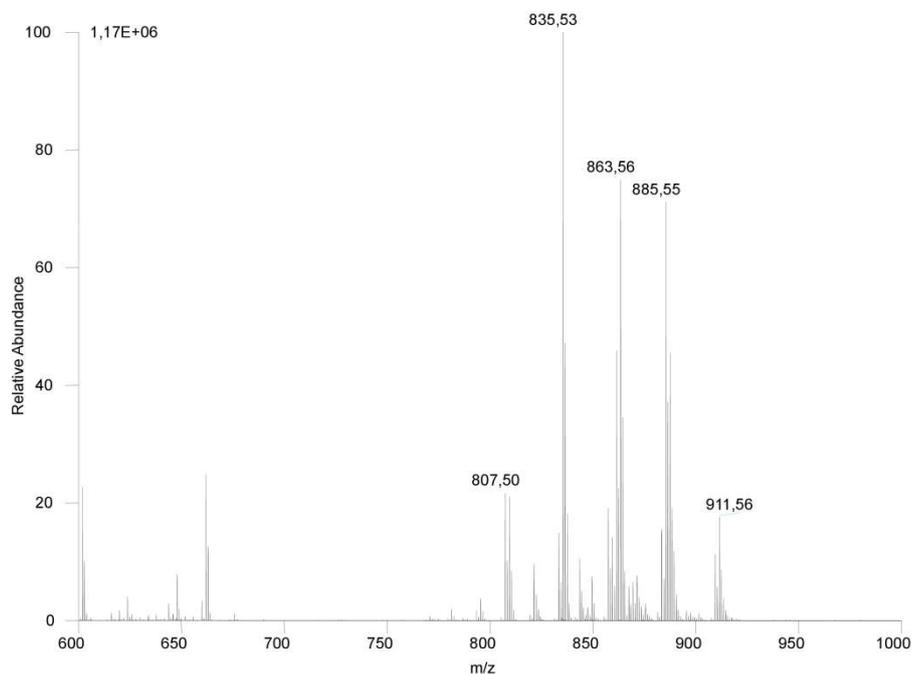


Figure 97 : Spectre de masse des phosphatidylinositols de macrophages THP1

:m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
835,53	PI (16:0/18:1)	100	
885,55	PI (18:0/20:4)	95,00	2,00
863,56	PI (18:0/18:1)	71,28	2,68
887,56	PI (18:0/20:3)	51,44	4,96
861,55	PI (18:1/18:1)	48,75	1,65
857,52	PI (16:0/20:4)	26,65	4,89
807,5	PI (16:0/16:1) PI (14:0/18:1)	20,98	1,34
809,52	PI (16:0/16:0)	18,61	1,85
883,53	PI (18:1/20:4) PI (16:0/22:5)	18,48	2,10
859,53	PI (18:1/18:2) PI (16:0/20:3)	17,21	2,13
837,54	PI (16:0/18:0)	15,70	1,31
833,52	PI (16:1/18:1) PI (16:0/18:2)	15,40	0,22
911,56	PI (18:0/22:5)	13,49	2,59
843,54	PI (O-16:0/20:4)	12,15	1,78
889,58	PI (18:0/20:2)	10,55	0,50
871,57	PI (O-18:0/20:4) PI (O-16:0/22:4)	8,02	0,48
869,55	PI (O-16:0/22:5)	6,97	0,61
867,54	PI (O-16:0/22:6)	5,37	1,17

Tableau 39 : Identification des ions de phosphatidylinositols de macrophages THP1

## 2.5 Etude des cardiolipines

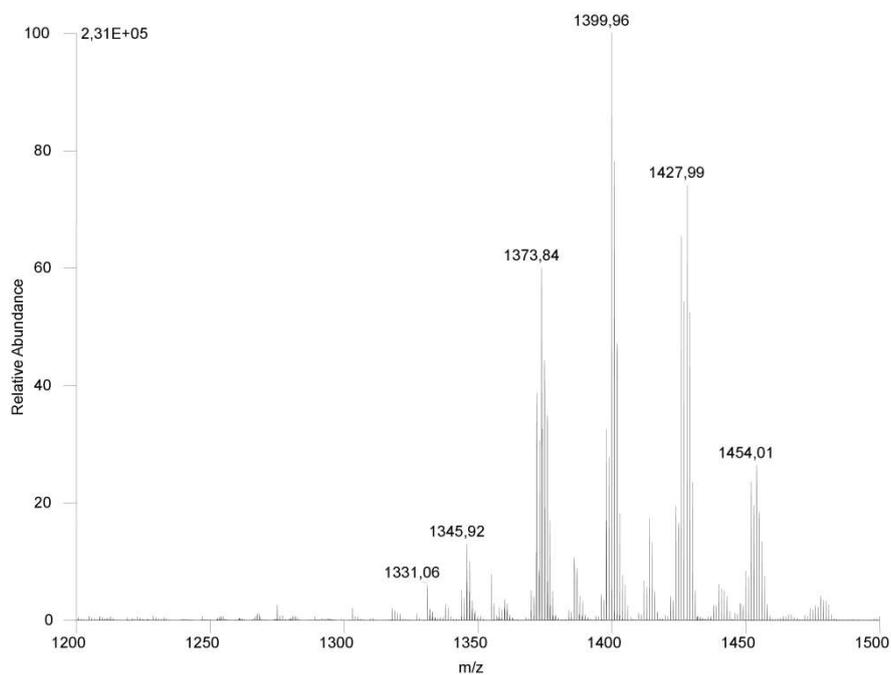


Figure 98 : Spectre de masse des cardiolipines de macrophages THP1

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
<b>1373,84</b>	CL (14:0/18:1_16:1/18:1) CL (16:0/16:1_16:1/18:1)	100	
<b>1399,96</b>	CL (16:1/18:1_16:1/18:1)	85,50	9,17
<b>1427,99</b>	CL (16:1/18:1_18:1/18:1)	78,29	9,77
<b>1425,98</b>	CL (16:1/18:1_18:1/18:2)	75,32	0,04
<b>1401,98</b>	CL (16:1/18:1_16:0/18:1) CL (16:1/18:1_16:1/18:0)	39,45	4,47
<b>1397,89</b>	CL (16:1/18:2_16:1/18:1) CL (16:1/16:1_18:1/18:2)	37,71	3,08
<b>1454,01</b>	CL (18:1/18:2_18:1/18:1)	30,30	1,02
<b>1451,99</b>	CL (18:1/18:2_18:1/18:2)	30,07	1,05
<b>1371,83</b>	CL (16:1/16:1_16:1/18:1) CL (14:0/18:2_16:1/18:1)	23,19	0,39
<b>1455,94</b>	CL (18:1/18:1/18:118:1)	14,06	0,50

Tableau 40 : Identification des ions de cardiolipines de macrophages THP1

## 2.6 Etude des phosphatidylglycérols et acides phosphatidiques

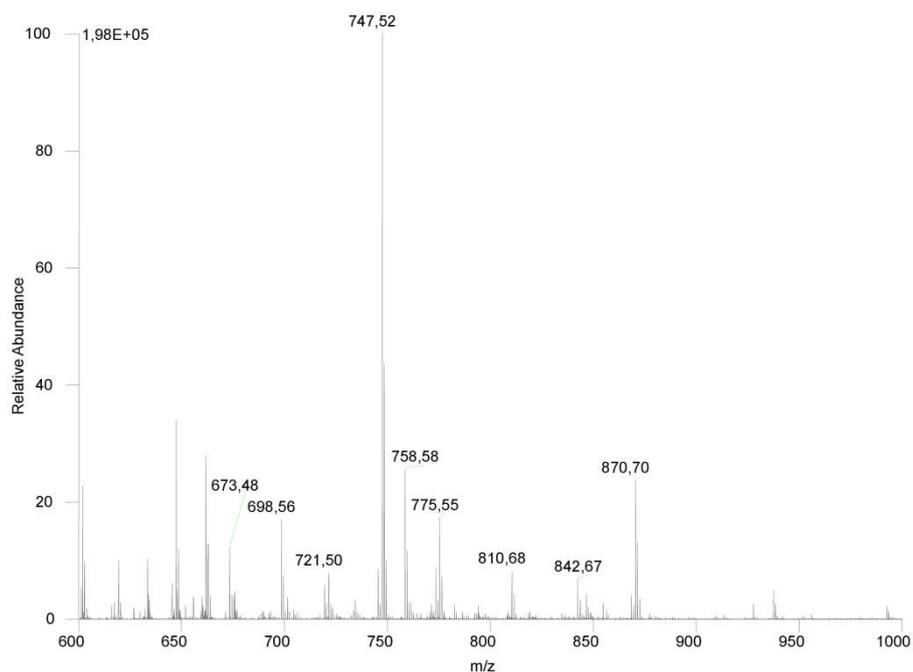


Figure 99 : Spectre de masse des phosphatidylglycérols de macrophages THP1

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
747,52	PG (16:0/18:1)	100	
673,48	PA (16:0/18:1)	17,83	4,81
775,59	PG (18:0/18:1)	13,15	7,41
721,5	PG (16:0/16:0)	10,45	2,41
749,53	PG (16:0/18:0)	10,22	1,24
773,53	PG (18:1/18:1)	8,38	0,60
745,5	PG (16:1/18:1)	7,38	1,27
719,49	PG (16:0/16:1) PG (14:0/18:1)	5,58	0,23
693,47	PG (14:0/16:0)	1,79	0,80

Tableau 41 : Identification des ions de phosphatidylglycérols et acide phosphatidique de macrophages THP1

## 2.7 Etude des sphingomyélines

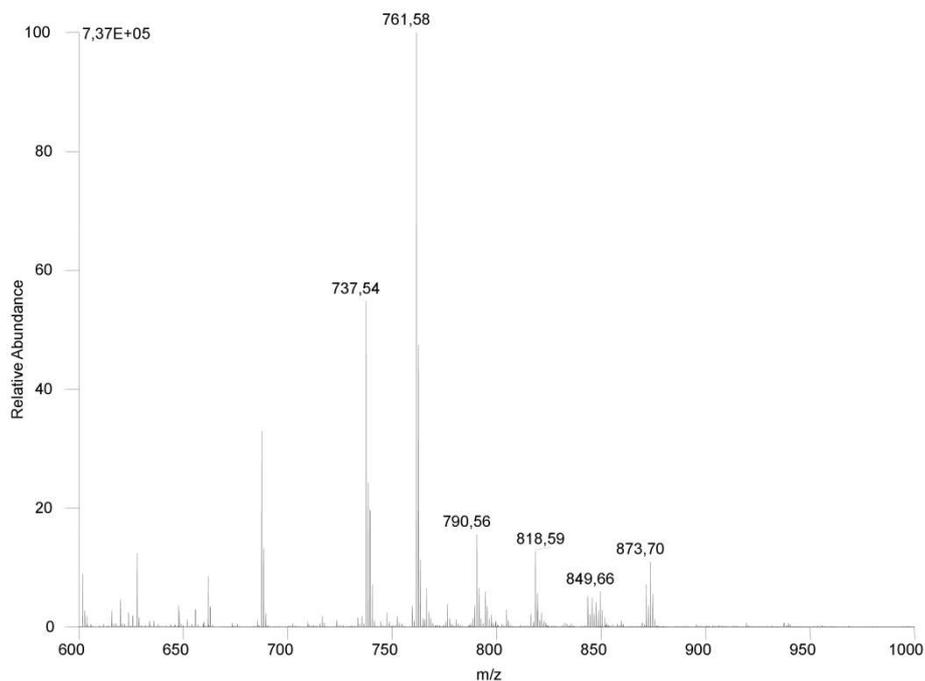


Figure 100 : Spectre de masse des sphingomyélines de macrophages THP1

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
761,58	SM (d18:1/16:0)	100	
873,7	SM (d18:1/24:0)	17,56	0,62
871,57	SM (d18:1/24:1)	11,07	0,42
763,59	SM (d18:0/16:0)	10,79	0,29
847,68	SM (d18:0/22:0)	5,57	0,42
845,64	SM (d18:1/22:0)	5,16	0,20
759,57	SM (d18:2/16:0)	3,23	0,24
875,72	SM (d18:0/24:0)	1,91	0,01

Tableau 42 : Identification des ions de sphingomyélines de macrophages THP1

## 2.8 Étude des hexosylcéramides et gangliosides

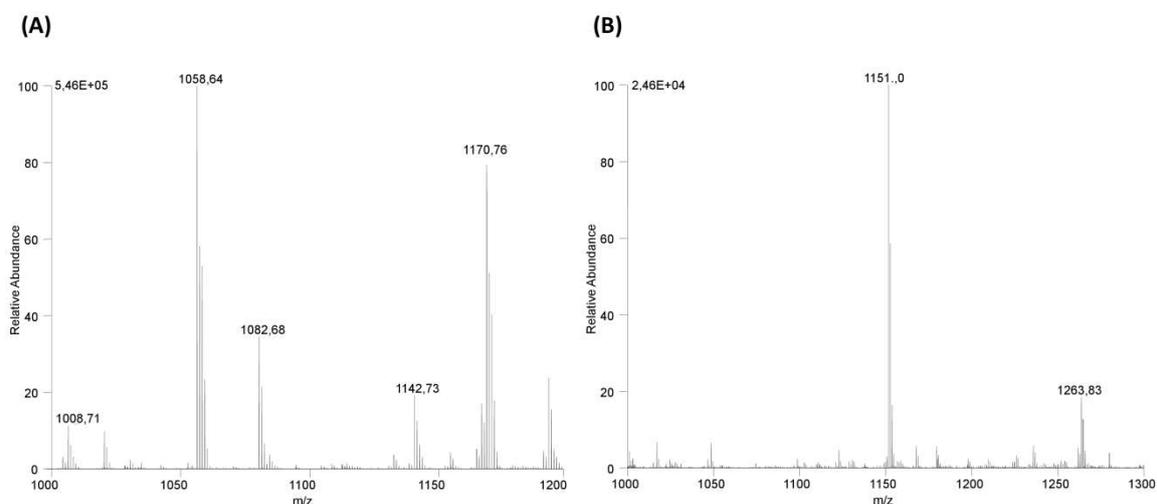


Figure 101 : Spectre de masse des hexosylcéramides (A) et des gangliosides (B) de macrophages THP1

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
1170,76	Trihexosylceramide (d18:1/24:0)	100	
1058,64	Trihexosylceramide (d18:1/16:0)	53,73	15,37
1172,77	Trihexosylceramide (d18:0/24:0)	44,21	5,24
1142,73	Trihexosylceramide(d18:1/22:0)	27,71	1,98
1168,75	Trihexosylceramide (d18:1/24:1)	18,22	4,61
1008,71	Dihexosyl ceramide (d18:1/24:0)	13,89	6,09
1022,66	Dihexosyl ceramide (d18:1/24:1)	10,12	3,74
1261,72	GM3(d18:1/24:1)	100	
1263,83	GM3 (d18:1/24:0)	8,64	4,70

Tableau 43 : Identification des ions dehexosylcéramides et des gangliosides de macrophages THP1

### 3 Annexe 3 : Composition des macrophages Humains ou HMDM

#### 3.1 Etude des phosphatidylcholines

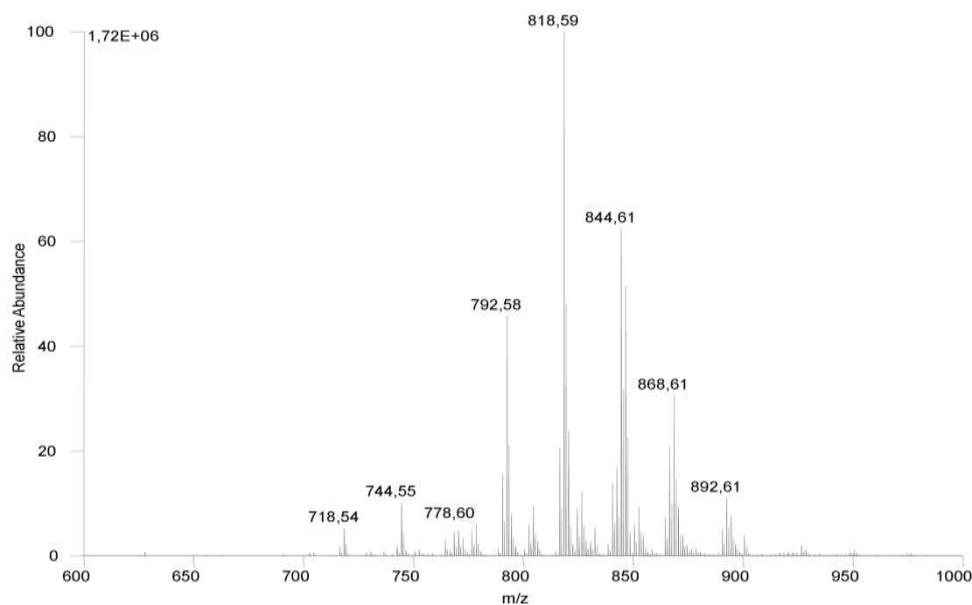


Figure 102 : Spectre de masse des phosphatidylcholines de macrophages HMDM

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
818,59	PC (16:0/18:1) PC (16:1/18:0)	100	
792,57	PC (16:0/16:0)	65,32	6,41
844,60	PC (18:1/18:1)	59,55	0,69
846,62	PC (18:0/18:1) PC (16:0/20:1)	27,67	0,84
790,56	PC (16:0/16:1) PC (14:0/18:1)	24,06	4,41
816,57	PC (16:1/18:1) PC (16:0/18:2)	22,97	2,10
866,59	PC (18:1/20:4)	18,64	7,50
840,58	PC (16:0/20:4)	17,93	5,33
820,59	PC (16:0/18:0)	14,65	4,84
842,59	PC (16:0/20:3) PC (18:1/18:2)	14,59	0,69
892,60	PC (18:0/22:6) PC (18:1/22:5)	8,87	0,61
764,54	PC (14:0/16:0)	8,86	1,94
826,60	PC (O-16:0/20:4)	8,55	1,94
852,61	PC (P-18:0/20:4) PC (O-16:0/22:5)	8,50	0,24
824,57	PC (P-16:0/20:4)	8,34	2,99
894,61	PC (20:1/20:4) PC (18:1/22:4) PC (18:0/22:5)	6,58	0,29
776,58	PC (O-16:0/16:1) PC (P-16:0/16:0) PC (P-18:0/14:0)	5,58	2,21
870,62	PC (18:0/20:3) PC (18:1/20:2)	5,51	2,70
854,62	PC (O-18:0/20:4) PC (O-16:0/22:4)	2,94	1,06
876,61	PC (P-18:0/22:6)	1,60	0,01
878,62	PC (P18:0/22:5)	1,33	0,57

Tableau 44 : Identification des ions de phosphatidylcholines de macrophages HMDM

## 3.2 Etude des phosphatidyléthanolamines

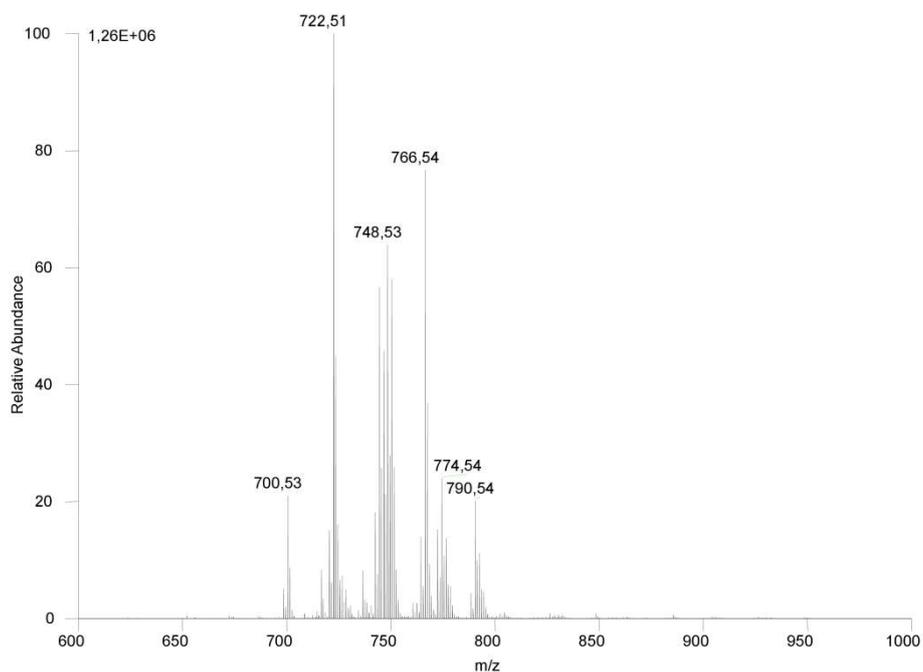


Figure 103 : Spectre de masse des phosphatidylethanolamines de macrophages HMDM

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
722,51	PE (P-16:0/20:4) PE (O-16:0/20:5)	100	
766,54	PE (18:0/20:4) PE (18:1/20:3)	93,89	0,63
748,53	PE (O-18:2/20:4) PE (P-16:0/22:5)	80,01	0,58
744,55	PE (18:0/18:1)	67,39	0,32
750,54	PE (P-18:0/20:4) PE (P-16:0/22:4)	55,26	2,86
746,51	PE (P-16:0/22:6) PE (O-18:2/20:5)	50,73	5,36
774,54	PE (O-18:2/22:5) PE (P-18:0/22:6)	30,65	1,81
742,54	PE (18:1/18:1) PE (18:0/18:2)	28,19	1,30
776,56	PE (P-18:0/22:5) PE (O-18:2/22:4)	23,25	0,48
772,53	PE (O-18:2/22:6)	22,94	2,83
700,53	PE (P-16:0/18:1) PE (O-18:2/16:0)	21,80	4,70
716,52	PE (16:0/18:1) PE (16:1/18:0)	18,89	2,59
768,55	PE (18:0/20:3) PE (18:1/20:2)	10,54	2,65
778,57	PE (P-18:0/22:4) PE (P-20:0/20:4) PE (O-18:0/22:5)	10,44	0,66
724,52	PE (O-16:0/20:4) PE (P-16:0/20:3)	9,28	0,18
752,54	PE (O-18:0/20:4) PE (P-18:0/20:3)	5,83	2,27

Tableau 45 : Identification des ions de phosphatidylethanolamines de macrophages HMDM

### 3.3 Etude des phosphatidylsérines

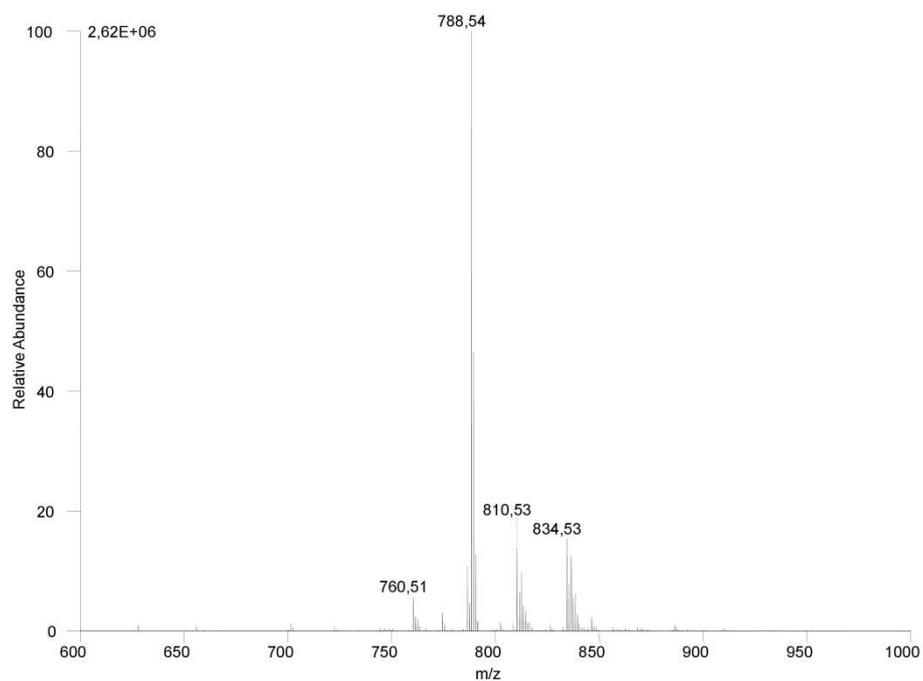


Figure 104 : Spectre de masse des phosphatidylsérines de macrophages HMDM

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
788,54	PS (18:0/18:1)	100	
834,53	PS (18:0/22:6) PS (18:1/22:5)	12,68	3,68
790,55	PS (18:0/18:0)	12,26	0,23
836,54	PS (18:0/22:5)	11,39	4,89
810,53	PS (18:0/20:4) PS (18:1/20:3)	10,97	4,51
760,51	PS (16:1/18:0) PS (16:0/18:1)	10,24	1,34
786,53	PS (18:1/18:1) PS (18:0/18:2)	9,69	4,48
812,54	PS (18:0/20:3)	7,25	1,40
838,56	PS (18:0/22:4)	4,98	2,10
762,53	PS (16:0/18:0)	4,50	1,21
814,56	PS (18:0/20:2) PS (18:1/20:1)	2,72	0,92
840,57	PS (18:0/22:3)	0,87	0,49

Tableau 46 : Identification des ions de phosphatidylsérines de macrophages HMDM

### 3.4 Etude des phosphatidylinositols

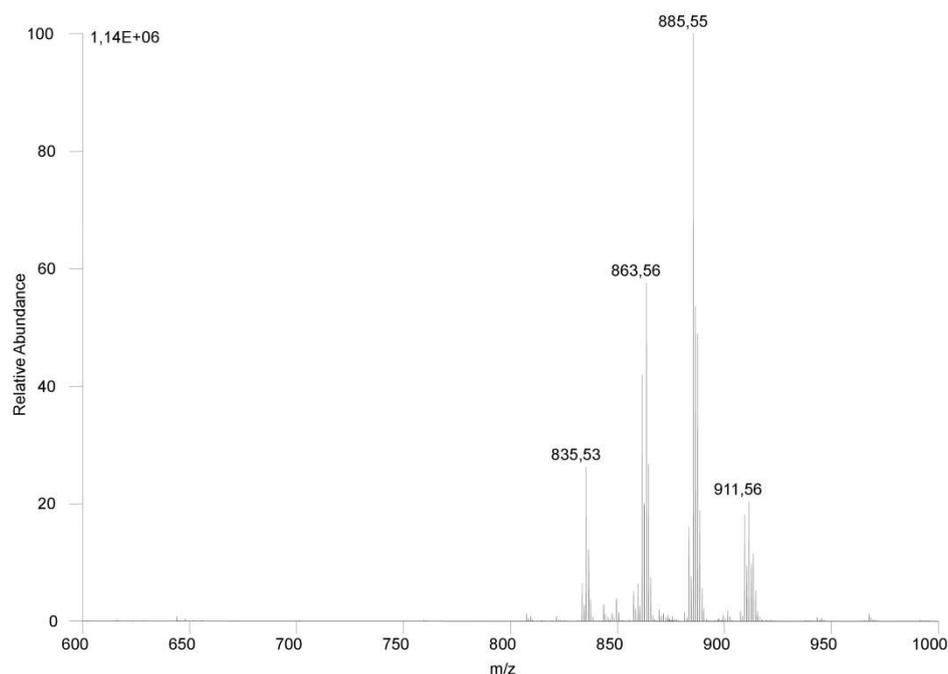


Figure 105 : Spectre de masse des phosphatidylinositols de macrophages HMDM

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
885,55	PI (18:20:4) PI (18:1/20:3)	100	
863,56	PI (18:0/18:1)	51,68	10,77
887,56	PI (18:0/20:3)	49,01	2,04
861,55	PI (18:1/18:1) PI (18:0/18:2)	44,17	3,24
835,53	PI (16:0/18:1) PI (16:1/18:0)	27,49	0,81
911,56	PI (18:0/22:5)	18,75	0,40
883,53	PI (18:1/20:4) PI (16:0/22:5)	18,16	2,84
909,55	PI (18:0/22:6) PI (18:1/22:5)	17,73	0,60
833,52	PI (18:1/16:1) PI (16:0/18:2)	9,84	3,69
913,58	PI (18:0/22:4)	9,57	1,29
859,53	PI (18:1/18:2) PI (16:0/20:3)	7,20	1,01
857,52	PI (16:0/20:4)	6,31	1,53
869,55	PI (P-18:0/20:4) PI (O-16:0/22:5)	5,12	1,18
889,57	PI (18:0/20:2) PI (18:1/20:1)	4,81	0,47
897,58	PI (O-18:0/22:5) PI (P-18:0/22:4)	1,29	0,63
895,57	PI (P-18:0/22:5)	1,26	0,69
899,60	PI (P-18:0/22:3)	0,67	0,37

Tableau 47 : Identification des ions de phosphatidylinositols de macrophages HMDM

### 3.5 Etude des cardiolipines

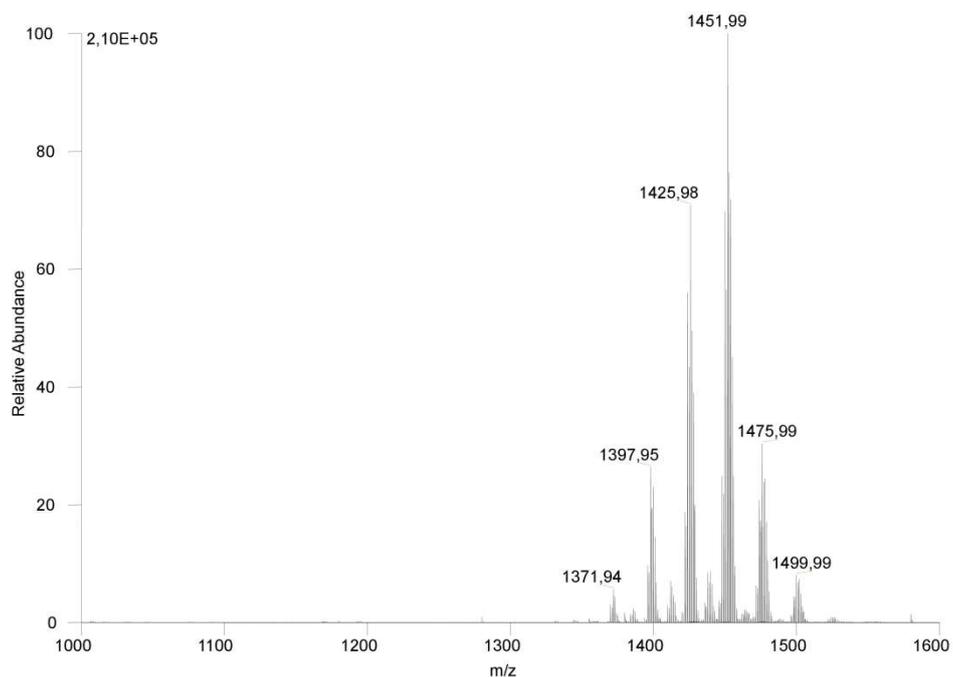


Figure 106 : Spectre de masse des cardiolipines de macrophages HMDM

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
1425,98	CL (16:1/18:1_18:1/18:2)	100	
1451,99	CL (18:1/18:2_18:1/18:2)	86,51	4,36
1423,96	CL (16:1/18:2_18:1/18:2)	83,73	13,00
1449,98	CL (18:1/18:2_18:2/18:2)	66,87	1,59
1454,00	CL (18:0/18:2_18:1/18:2) CL (18:1/18:1_18:1/18:2) CL (18:1/18:1_16:1/20:3)	64,94	3,94
1397,95	CL (16:1/18:2_16:1/18:1) CL (16:1/16:1_18:1/18:2) CL (14:0/18:2_18:1/18:2)	51,05	0,20
1399,96	CL (16:1/18:1_16:1/18:1)	43,96	8,11
1475,99	CL (18:1/18:2_18:2/20:3)	31,19	3,80
1478,00	CL (18:1/18:2_18:1/20:3)	20,62	1,55

Tableau 48 : Identification des ions de cardiolipines de macrophages HMDM

### 3.6 Étude des phosphatidylglycérols

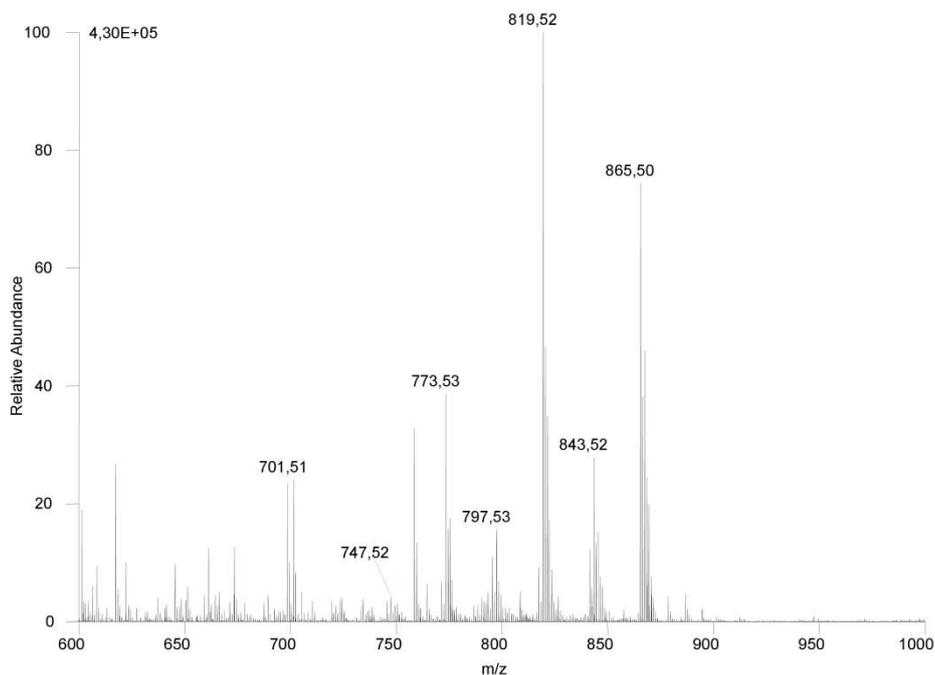


Figure 107 : Spectre de masse des phosphatidylglycérols de macrophages HMDM

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
865,50	PG (22:6/22:6)	100	
773,53	PG (18:1/18:1)	93,79	5,19
821,53	PG (18:1/22:5)	78,10	4,75
701,51	PA (18:0/18:1)	56,03	1,36
747,52	PG (16:0/18:1)	38,00	1,68

Tableau 49 : Identification des ions de phosphatidylglycérols de macrophages HMDM

### 3.7 Etude des sphingomyélines

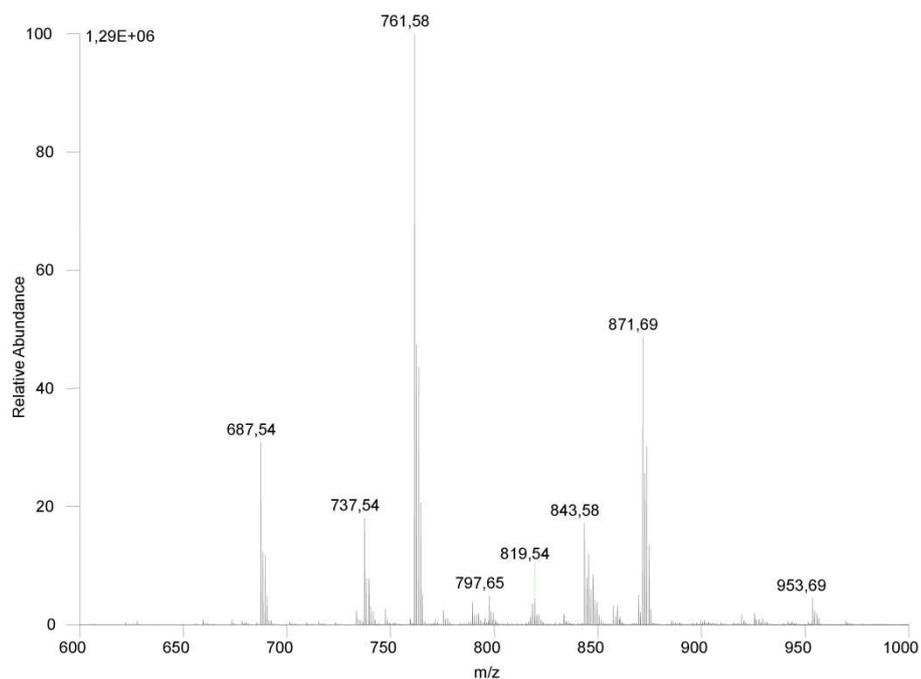


Figure 108 : Spectre de masse des sphingomyélines de macrophages HMDM

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
761,58	SM (d18:1/16:0)	100	
871,57	SM (d18:1/24:1)	51,81	1,50
873,70	SM (d18:1/24:0)	29,11	4,47
763,59	SM (d18:0/16:0)	21,55	2,07
847,64	SM (d18:0/22:0)	10,86	2,42
845,61	SM (d18:1/22:0)	10,50	1,96
869,67	SM (d18:2/24:1)	5,41	0,61
733,55	SM (d18:1/14:0)	2,34	0,29

Tableau 50 : Identification des ions de sphingomyélines de macrophages HMDM

### 3.8 Etude des gangliosides

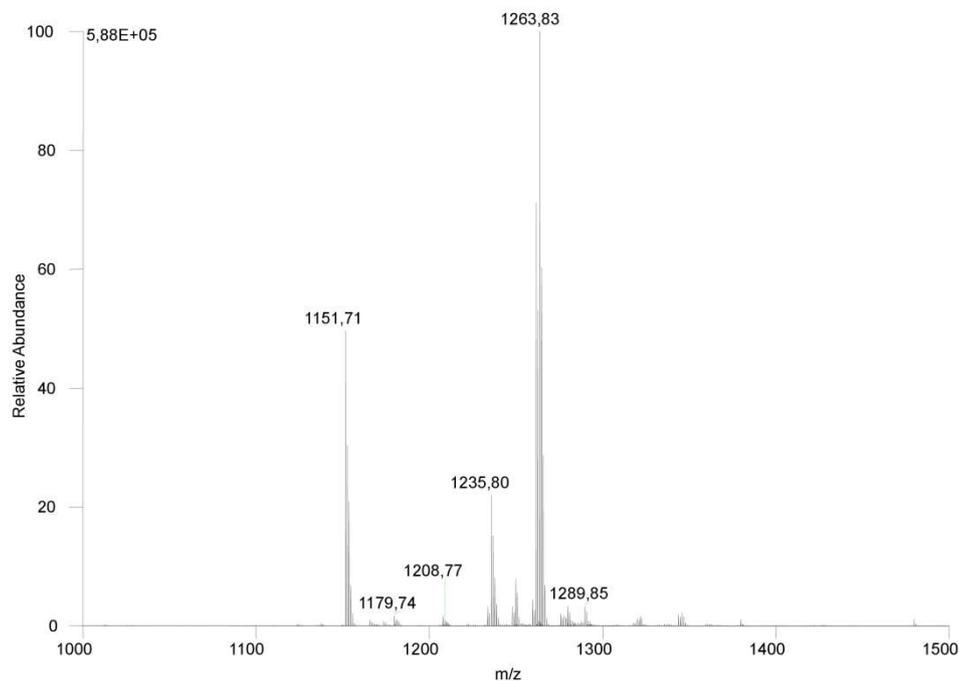


Figure 109 : Spectre de masse des gangliosides de macrophages HMDM

m/z	Identification	% de l'ion majoritaire	Ecart type
1263,83	GM3 (d18:1/24:0)	100	
1261,82	GM3 (d18:1/24:1)	85,64	11,65
1151,71	GM3 (d18:1/16:0)	63,65	10,75
1235,80	GM3 (d18:1/22:0)	22,35	3,03
1153,71	GM3 (d18:0/16:0)	21,62	0,46
1265,84	GM3 (d18:0/24:0)	18,94	7,73
1249,82	GM3 (d18:1/23:0)	7,70	0,31

Tableau 51 : Identification des ions de gangliosides de macrophages HMDM

# Références

---

1. Christie, W. W. What is a Lipid? - AOCs Lipid Library. Available at: <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39371>.
2. Christie, W. W. & Han, X. Chapter 1 - Lipids: their structures and occurrence. in *Lipid Analysis (Fourth edition)* 3–19 (Woodhead Publishing, 2012). doi:10.1533/9780857097866.3
3. Carrasco-Pancorbo, A., Navas-Iglesias, N. & Cuadros-Rodríguez, L. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **28**, 263–278 (2009).
4. Fahy, E. *et al.* A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, 839–861 (2005).
5. Schmeltzer, K., Fahy, E., Subramaniam, S. & Dennis, E. A. The Lipid Maps Initiative in Lipidomics. *Methods Enzymol.* **432**, 171–183 (2007).
6. Fahy, E. *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S9-14 (2009).
7. Fahy, E., Cotter, D., Sud, M. & Subramaniam, S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1811**, 637–647 (2011).
8. Fahy, E. *et al.* Bioinformatics for Lipidomics. *Methods Enzymol.* **432**, 247–273 (2007).
9. LIPID MAPS Lipidomics Gateway : Lipidomics Resources. Available at: [http://www.lipidmaps.org/data/classification/LM\\_classification\\_exp.php](http://www.lipidmaps.org/data/classification/LM_classification_exp.php).
10. Blackwood, J. E., Gladys, C. L., Loening, K. L., Petrarca, A. E. & Rush, J. E. Unambiguous specification of stereoisomerism about a double bond. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 509–510 (1968).
11. Smit, E. N., Muskiet, F. A. J. & Boersma, E. R. The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **71**, 241–250 (2004).
12. Astarita, G., Kendall, A. C., Dennis, E. A. & Nicolaou, A. Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 456–468 (2015).
13. Buczynski, M. W., Dumlao, D. S. & Dennis, E. A. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J. Lipid Res.* **50**, 1015–1038 (2009).
14. Nicolaou, A., Mauro, C., Urquhart, P. & Marelli-Berg, F. Polyunsaturated Fatty Acid-derived lipid mediators and T cell function. *Front. Immunol.* **5**, 75 (2014).
15. Nicolaou, A. Eicosanoids in skin inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **88**, 131–138 (2013).
16. Beller, M., Thiel, K., Thul, P. J. & Jackle, H. Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett.* **584**, 2176–2182 (2010).
17. van Meer, G. & de Kroon, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8 (2011).
18. Vance, J. E. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic Cph. Den.* **16**, 1–18 (2015).
19. Ridgway, N. D. Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* **1484**, 129–141 (2000).
20. Kolter, T. A view on sphingolipids and disease. *Chem. Phys. Lipids* **164**, 590–606 (2011).
21. Hla, T. & Dannenberg, A. J. Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell Metab.* **16**, 420–434 (2012).
22. Morgan, A. E., Mooney, K. M., Wilkinson, S. J., Pickles, N. A. & Mc Auley, M. T. Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Res. Rev.* **27**, 108–124 (2016).
23. Libong, D., Héron, S., Tchaplá, A. & Chaminade, P. Lipid Analysis with the Corona CAD. in *Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques* 221–287 (John Wiley & Sons, Inc., 2017). doi:10.1002/9781119390725.ch5
24. Christie, W. W. Preparations of lipid extracts from tissues. *Two oily Press.* 195–213 (1993).
25. Wu, H., Southam, A. D., Hines, A. & Viant, M. R. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal. Biochem.* **372**, 204–212 (2008).
26. Lam, S. M. *et al.* Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J. Lipid Res.* **55**, 289–298 (2014).
27. Sato, Y. *et al.* Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer’s disease using metabolomics technology. *J. Lipid Res.* **53**, 567–576 (2012).
28. Giera, M. *et al.* Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC–MS/MS. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 1415–1424 (2012).
29. Bouatra, S. *et al.* The human urine metabolome. *PLoS One* **8**, e73076 (2013).
30. Adkins, J. N. *et al.* Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **1**, 947–955 (2002).
31. Teo, C. C. *et al.* Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **66**, 1–18 (2015).
32. Stubiger, G. *et al.* Targeted profiling of atherogenic phospholipids in human plasma and lipoproteins of hyperlipidemic patients using MALDI-QIT-TOF-MS/MS. *Atherosclerosis* **224**, 177–186 (2012).

33. Zhao, Z. & Xu, Y. An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples. *J. Lipid Res.* **51**, 652–659 (2010).
34. t'Kindt, R. *et al.* Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 403–411 (2012).
35. Sheng, J., Vannela, R. & Rittmann, B. E. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. *Bioresour. Technol.* **102**, 1697–1703 (2011).
36. Grima, E. M. *et al.* Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 955–959 (1994).
37. Lee, S. J., Yoon, B.-D. & Oh, H.-M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* **12**, 553–556 (1998).
38. Smedes, F. & Thomasen, T. K. Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. *Mar. Pollut. Bull.* **32**, 681–688 (1996).
39. Lin, J.-H., Liu, L.-Y., Yang, M.-H. & Lee, M.-H. Ethyl acetate/ethyl alcohol mixtures as an alternative to folch reagent for extracting animal lipids. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4984–4986 (2004).
40. Folch, Jo., Lees, M. & Sloane Stanley, G. . A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).
41. Bligh, E. . & Dyer, W. . A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 911–917 (1959).
42. Smedes, F. & Askland, T. k. Revisiting the Development of the Bligh and Dyer Total Lipid Determination Method. *Mar. Pollut. Bull.* **38**, 193–201 (1999).
43. Manirakiza, P., Covaci, A. & Schepens, P. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roesse-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *J. Food Compos. Anal.* **14**, 93–100 (2001).
44. Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A. & Schwudke, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* **49**, 1137–1146 (2008).
45. Patterson, R. E., Ducrocq, A. J., McDougall, D. J., Garrett, T. J. & Yost, R. A. Comparison of blood plasma sample preparation methods for combined LC-MS lipidomics and metabolomics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **1002**, 260–266 (2015).
46. Tumanov, S. & Kamphorst, J. J. Recent advances in expanding the coverage of the lipidome. *Curr. Opin. Biotechnol.* **43**, 127–133 (2017).
47. Lam, S. M., Tian, H. & Shui, G. Lipidomics, en route to accurate quantitation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* (2017). doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.02.008>
48. Raterink, R.-J., Lindenburg, P. W., Vreeken, R. J., Ramautar, R. & Hankemeier, T. Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics. *TrAC Trends Anal. Chem.* **61**, 157–167 (2014).
49. Jurowski, K. *et al.* Comprehensive review of trends and analytical strategies applied for biological samples preparation and storage in modern medical lipidomics: State of the art. *TrAC Trends Anal. Chem.* **86**, 276–289 (2017).
50. Smith, R. M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Century Chromatogr. 1903-2003* **1000**, 3–27 (June).
51. Poole, C. F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* **22**, 362–373 (2003).
52. Kataoka, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **22**, 232–244 (2003).
53. Poole, C. F., Gunatilleka, A. D. & Sethuraman, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **885**, 17–39 (2000).
54. Ruiz-Gutiérrez, V. & Pérez-Camino, M. C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr. A* **885**, 321–341 (2000).
55. Juaneda, P. & Rocquelin, G. Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* **20**, 40–41 (1985).
56. Bateman, H. G. & Jenkins, T. C. Method for Extraction and Separation by Solid Phase Extraction of Neutral Lipid, Free Fatty Acids, and Polar Lipid from Mixed Microbial Cultures. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 132–134 (1997).
57. Kaluzny, M. A., Duncan, L. A., Merritt, M. V. & Epps, D. E. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J. Lipid Res.* **26**, 135–140 (1985).
58. Mouahid, A., Crampon, C., Toudji, S.-A. A. & Badens, E. Supercritical {CO<sub>2</sub>} extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling. *J. Supercrit. Fluids* **77**, 7–16 (2013).
59. Subra-Paternault, P., ThongDeng, H., Grélard, A. & Cansell, M. Extraction of phospholipids from scallop by-product using supercritical CO<sub>2</sub>/alcohol mixtures. *LWT - Food Sci. Technol.* **60**, 990–998 (2015).
60. Ichihara, K. *et al.* Fatty acid analysis of triacylglycerols: Preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography. *Anal. Biochem.* **495**, 6–8 (2016).
61. Myher, J. J., Kuksis, A., Marai, L. & Sandra, P. Identification of the more complex triacylglycerols in bovine milk fat by gas chromatography-mass spectrometry using polar capillary columns. *J. Chromatogr.* **452**, 93–118 (1988).
62. Řezanka, T. & Řezanková, H. Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Anal. Chim. Acta* **398**, 253–261 (1999).
63. Li, M., Zhou, Z., Nie, H., Bai, Y. & Liu, H. Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 243–249 (2011).

64. Christie, W. W. Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **33**, 343–353 (1998).
65. Christie, W. W. & Han, X. Chapter 8 - Gas chromatographic analysis of fatty acid derivatives. in *Lipid Analysis (Fourth edition)* (eds. Christie, W. W. & Han, X.) 159–180 (Woodhead Publishing, 2012). doi:10.1533/9780857097866.159
66. Martin, C. A., de Oliveira, C. C., Visentainer, J. V., Matsushita, M. & de Souza, N. E. Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for the gas chromatographic analysis of trans fatty acids. *27th Int. Symp. Sep. Proteins Pept. Polynucleotides* **1194**, 111–117 (2008).
67. Blasko, J. *et al.* Chemometric deconvolution of gas chromatographic unresolved conjugated linoleic acid isomers triplet in milk samples. *J. Chromatogr. A* **1216**, 2757–2761 (2009).
68. Lepage, G. & Roy, C. C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* **27**, 114–120 (1986).
69. Mendoza, L. G. *et al.* Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of milk fat by an ionic liquid derived from L-phenylalanine as the stationary phase. *Talanta* **143**, 212–218 (2015).
70. Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A. & Pelka, J. R. Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.* **38**, 514–515 (1966).
71. Wang, Y., Krull, I. S., Liu, C. & Orr, J. D. Derivatization of phospholipids. *J. Chromatogr. B* **793**, 3–14 (2003).
72. Baranowski, R. & pacha, K. Gas Chromatographic Determination of Prostaglandins. *Mini Rev. Med. Chem.* **2**, 135–144 (2002).
73. Blomberg, J., Schoenmakers, P. J. & Brinkman, U. A. Gas chromatographic methods for oil analysis. *J. Chromatogr. A* **972**, 137–173 (2002).
74. Schoenmakers, P. J. Optimization of chromatographic selectivity. A guide to method development. By P. J. Schoenmakers. Journal of Chromatography Library, Volume 35 Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 1986. *J. High Resolut. Chromatogr.* **11**, 144–144 (1988).
75. CAUDE, M. & JARDY, A. Chromatographie en phase liquide Théorie et méthodes de séparation. *Tech. Ing. Chromatogr. Tech. Séparatives base documentaire : TIB385DUO.*, (1994).
76. Grit, M., Crommelin, D. J. A. & Lang, J. Determination of phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and their lyso forms from liposome dispersions by high-performance liquid chromatography using high-sensitivity refractive index detection. *J. Chromatogr. A* **585**, 239–246 (1991).
77. Snyder, L. R. & Schunk, T. C. Retention mechanism and the role of the mobile phase in normal-phase separation on amino-bonded-phase columns. *Anal. Chem.* **54**, 1764–1772 (1982).
78. Christie, W. W. & Anne Urwin, R. Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases. *J. High Resolut. Chromatogr.* **18**, 97–100 (1995).
79. Silversand, C. & Haux, C. Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **703**, 7–14 (1997).
80. Arnoldsson, K. C. & Kaufmann, P. Lipid class analysis by normal phase high performance liquid chromatography, development and optimization using multivariate methods. *Chromatographia* **38**, 317–324 (1994).
81. Sas, B., Peys, E. & Helsen, M. Efficient method for (lyso)phospholipid class separation by high-performance liquid chromatography using an evaporative light-scattering detector. *J. Chromatogr. A* **864**, 179–182 (1999).
82. Deschamps, F. S., Chaminade, P., Ferrier, D. & Baillet, A. Assessment of the retention properties of poly (vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **928**, 127–137 (2001).
83. Nordbäck, J., Lundberg, E. & Christie, W. W. Separation of lipid classes from marine particulate material by HPLC on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase using dual-channel evaporative light-scattering detection. *Mar. Chem.* **60**, 165–175 (1998).
84. Donot, F. *et al.* Analysis of neutral lipids from microalgae by HPLC-ELSD and APCI-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **942–943**, 98–106 (2013).
85. Rocha, J. M., Kalo, P. J., Ollilainen, V. & Malcata, F. X. Separation and identification of neutral cereal lipids by normal phase high-performance liquid chromatography, using evaporative light-scattering and electrospray mass spectrometry for detection. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3013–3025 (2010).
86. Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P. & Loiseau, P. M. Miltefosine Affects Lipid Metabolism in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1425–1430 (2007).
87. Büniger, H. & Pison, U. Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **672**, 25–31 (1995).
88. Hvattum, E., Uran, S., Sandbæk, A. G., Karlsson, A. Å. & Skotland, T. Quantification of phosphatidylserine, phosphatidic acid and free fatty acids in an ultrasound contrast agent by normal-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**, 506–512 (2006).
89. Ramos, R. G. *et al.* Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of *Leishmania* membrane phospholipids. *J. Chromatogr. A* **1209**, 88–94 (2008).
90. Zheng, L. *et al.* Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 2074–2082 (2010).
91. Conforti, F. D., Harris, C. H. & Rinehart, J. T. High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector. *J. Chromatogr. A* **645**, 83–88 (1993).
92. Graeve, M. & Janssen, D. Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids. *J. Chromatogr. B* **877**, 1815–1819 (2009).

93. Homan, R. & Anderson, M. K. Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **708**, 21–26 (1998).
94. McLaren, D. G. *et al.* An ultraperformance liquid chromatography method for the normal-phase separation of lipids. *Anal. Biochem.* **414**, 266–272 (2011).
95. Perona, J. S. & Ruiz-Gutierrez, V. Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J. Sep. Sci.* **27**, 653–659 (2004).
96. Rodríguez-Alcalá, L. M. & Fontecha, J. Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3063–3066 (2010).
97. Christie, W. W. Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. *J. Lipid Res.* **26**, 507–12 (1985).
98. Christie, W. W. Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the “mass detector”. *J. Chromatogr. A* **361**, 396–399 (1986).
99. Locke, D. C. Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Chemically Bonded Stationary Phases. *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 433 (1974).
100. Martire, D. E. & Boehm, R. E. Unified theory of retention and selectivity in liquid chromatography. 2. Reversed-phase liquid chromatography with chemically bonded phases. *J. Phys. Chem.* **87**, 1045–1062 (1983).
101. Marqusee, J. A. & Dill, K. A. Solute partitioning into chain molecule interphases: Monolayers, bilayer membranes, and micelles. *J. Chem. Phys.* **85**, 434–444 (1986).
102. Ying, P. T., Dorsey, J. G. & Dill, K. A. Retention mechanisms of reversed-phase liquid chromatography: determination of solute-solvent interaction free energies. *Anal. Chem.* **61**, 2540–2546 (1989).
103. Dorsey, J. G. & Dill, K. A. The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography. *Chem. Rev.* **89**, 331–346 (1989).
104. Horváth, C., Melander, W. & Molnár, I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J. Chromatogr. A* **125**, 129–156 (1976).
105. Dill, K. A. The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography. *J. Phys. Chem.* **91**, 1980–1988 (1987).
106. Tchaplá, A., Héron, S., Lesellier, E. & Colin, H. General view of molecular interaction mechanisms in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **656**, 81–112 (1993).
107. Hmida, D., Abderrabba, M., Tchaplá, A., Heron, S. & Moussa, F. Comparison of iso-elutotropic mobile phases at different temperatures for the separation of triacylglycerols in Non-Aqueous Reversed Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **990**, 45–51 (2015).
108. Lisa, M., Holcapek, M. & Sovova, H. Comparison of various types of stationary phases in non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry of glycerolipids in blackcurrant oil and its enzymatic hydrolysis mixture. *J. Chromatogr. A* **1216**, 8371–8378 (2009).
109. Lisa, M. & Holcapek, M. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1198–1199**, 115–130 (2008).
110. Martin, M., Thevenon, G. & Tchaplá, A. Comparison of retention mechanisms of homologous series and triglycerides in non-aqueous reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **452**, 157–173 (1988).
111. Bird, S. S., Marur, V. R., Sniatynski, M. J., Greenberg, H. K. & Kristal, B. S. Serum Lipidomics Profiling Using LC–MS and High-Energy Collisional Dissociation Fragmentation: Focus on Triglyceride Detection and Characterization. *Anal. Chem.* **83**, 6648–6657 (2011).
112. Schwab, U. *et al.* Triacylglycerol Fatty Acid Composition in Diet-Induced Weight Loss in Subjects with Abnormal Glucose Metabolism – the GENOBIN Study. *PLOS ONE* **3**, 1–10 (2008).
113. Alpert, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A* **499**, 177–196 (1990).
114. Buszewski, B. & Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 231–247 (2012).
115. Schwalbe-Herrmann, M., Willmann, J. & Leibfritz, D. Separation of phospholipid classes by hydrophilic interaction chromatography detected by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 5179–5183 (2010).
116. Zhu, C. *et al.* An efficient hydrophilic interaction liquid chromatography separation of 7 phospholipid classes based on a diol column. *J. Chromatogr. A* **1220**, 26–34 (2012).
117. Anesi, A. & Guella, G. A fast liquid chromatography-mass Spectrometry methodology for membrane lipid profiling through hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1384**, 44–52 (2015).
118. Cifkova, E., Hajek, R., Lisa, M. & Holcapek, M. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of (lyso)phosphatidic acids, (lyso)phosphatidylserines and other lipid classes. *J. Chromatogr. A* **1439**, 65–73 (2016).
119. Holcapek, M. *et al.* Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1377**, 85–91 (2015).
120. Rosset, R., Caude, M. & Jardy, A. *Chromatographie en phases liquide et supercritique.* (1991).

121. Yamada, T. *et al.* Supercritical fluid chromatography/Orbitrap mass spectrometry based lipidomics platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling. *J. Chromatogr. A* **1301**, 237–242 (2013).
122. Brossard, S., Lafosse, M., Dreux, M. & Becart, J. Abnormal composition of commercial waxes revealed by supercritical fluid chromatography. *Chromatographia* **36**, 268–274 (1993).
123. Lesellier, E. & Tchaplal, A. Separation of vegetable oil triglycerides by subcritical fluid chromatography with octadecyl packed columns and CO<sub>2</sub>/modifier mobile phases. *Chromatographia* **51**, 688–694 (2000).
124. Wang, S. *et al.* A novel stop-flow two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry method for lipid analysis. *J. Chromatogr. A* **1321**, 65–72 (2013).
125. Kadivar, S., De Clercq, N., Nusantoro, B. P., Le, T. T. & Dewettinck, K. Development of an offline bidimensional high-performance liquid chromatography method for analysis of stereospecific triacylglycerols in cocoa butter equivalents. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 7896–7903 (2013).
126. Dugo, P., Favoino, O., Tranchida, P. Q., Dugo, G. & Mondello, L. Off-line coupling of non-aqueous reversed-phase and silver ion high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the characterization of rice oil triacylglycerol positional isomers. *J. Chromatogr. A* **1041**, 135–142 (2004).
127. Dugo, P., Kumm, T., Crupi, M. L., Cotroneo, A. & Mondello, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrices. *J. Chromatogr. A* **1112**, 269–275 (2006).
128. Lisa, M., Cifkova, E. & Holcapek, M. Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5146–5156 (2011).
129. Li, M. *et al.* A not-stop-flow online normal-/reversed-phase two-dimensional liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry method for comprehensive lipid profiling of human plasma from atherosclerosis patients. *J. Chromatogr. A* **1372C**, 110–119 (2014).
130. Nie, H. *et al.* Lipid profiling of rat peritoneal surface layers by online normal- and reversed-phase 2D LC QToF-MS. *J. Lipid Res.* **51**, 2833–2844 (2010).
131. Nguyen, D. T.-T. *et al.* High throughput liquid chromatography with sub-2µm particles at high pressure and high temperature. *J. Chromatogr. A* **1167**, 76–84 (2007).
132. Heinisch, S. & Rocca, J.-L. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *Ed. Choice III* **1216**, 642–658 (2009).
133. Gika, H. G., Theodoridis, G., Exrance, J., Edge, A. M. & Wilson, I. D. High temperature-ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry for the metabonomic analysis of Zucker rat urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **871**, 279–287 (2008).
134. Kephart, T. S. & Dasgupta, P. K. Hot eluent capillary liquid chromatography using zirconia and titania based stationary phases. *Anal. Chim. Acta* **414**, 71–78 (2000).
135. Hazotte, A., Libong, D. & Chaminade, P. High-temperature micro liquid chromatography for lipid molecular species analysis with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **1140**, 131–139 (2007).
136. Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Plumb, R. S. & Wilson, I. D. Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87**, 12–25 (2014).
137. Fekete, S., Oláh, E. & Fekete, J. Fast liquid chromatography: The domination of core–shell and very fine particles. *J. Chromatogr. A* **1228**, 57–71 (2012).
138. Fekete, S., Kohler, I., Rudaz, S. & Guillarme, D. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87**, 105–119 (2014).
139. Gritti, F., Sanchez, C. A., Farkas, T. & Guiochon, G. Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3000–3012 (2010).
140. Fekete, S., Veuthey, J.-L., McCalley, D. V. & Guillarme, D. The effect of pressure and mobile phase velocity on the retention properties of small analytes and large biomolecules in ultra-high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1270**, 127–138 (2012).
141. Dolan, J. W. Dwell volume revisited. *LCGC N. Am.* **24**, 458–466 (2006).
142. Gritti, F., Leonardi, I., Abia, J. & Guiochon, G. Physical properties and structure of fine core–shell particles used as packing materials for chromatography. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3819–3843 (2010).
143. Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T. & Zhang, H. Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1357**, 36–52 (2014).
144. Kirkland, J. J., Schuster, S. A., Johnson, W. L. & Boyes, B. E. Fused-core particle technology in high-performance liquid chromatography: An overview. *J. Pharm. Anal.* **3**, 303–312 (2013).
145. Li, J. & Carr, P. W. Effect of temperature on the thermodynamic properties, kinetic performance, and stability of polybutadiene-coated zirconia. *Anal. Chem.* **69**, 837–843 (1997).
146. Yan, B., Zhao, J., Brown, J. S., Blackwell, J. & Carr, P. W. High-temperature ultrafast liquid chromatography. *Anal. Chem.* **72**, 1253–1262 (2000).
147. Guillarme, D., Schappler, J., Rudaz, S. & Veuthey, J.-L. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **29**, 15–27 (2010).
148. Rodriguez-Aller, M., Gurny, R., Veuthey, J.-L. & Guillarme, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. *J. Chromatogr. A* **1292**, 2–18 (2013).

149. Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C. P. B., Lucci, P. & Busquets, R. State-of-the-art in fast liquid chromatography–mass spectrometry for bio-analytical applications. *J. Chromatogr. B* **927**, 3–21 (2013).
150. Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.-L. & Guilleme, D. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends Anal. Chem.* **63**, 2–13 (2014).
151. Holcapek, M. *et al.* Lipidomic analysis of plasma, erythrocytes and lipoprotein fractions of cardiovascular disease patients using UHPLC/MS, MALDI-MS and multivariate data analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **990**, 52–63 (2015).
152. Tuñón-López, J. A. *et al.* Multiclass profiling of lipids of archaeological interest by ultra-high pressure liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-high resolution mass spectrometry. *Microchem. J.* **132**, 49–58 (2017).
153. Suarez-Garcia, S. *et al.* Development and validation of a UHPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of mammal lysophosphatidylcholines and lysophosphatidylethanolamines in serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **1055–1056**, 86–97 (2017).
154. Cutignano, A. *et al.* Profiling of complex lipids in marine microalgae by UHPLC/tandem mass spectrometry. *Algal Res.* **17**, 348–358 (2016).
155. Charlesworth, J. M. Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography. *Anal. Chem.* **50**, 1414–1420 (1978).
156. Christie, W. W. Detectors for high-performance liquid chromatography of lipids with special reference to evaporative light-scattering detection. *Adv. Lipid Methodol.* 239–271 (1992).
157. Zhou, J. Y. *et al.* Postcolumn fluorescence as an alternative to evaporative light scattering detection for ceramide analysis with gradient elution in non-aqueous reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **859**, 99–105 (1999).
158. Hazotte, A., Libong, D., Matoga, M. & Chaminade, P. Comparison of universal detectors for high-temperature micro liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1170**, 52–61 (2007).
159. Schönherr, C., Touchene, S., Wilsner, G., Peschka-Süss, R. & Francese, G. Simple and precise detection of lipid compounds present within liposomal formulations using a charged aerosol detector. *J. Chromatogr. A* **1216**, 781–786 (2009).
160. Márquez-Sillero, I., Cárdenas, S. & Valcárcel, M. Comparison of two evaporative universal detectors for the determination of sugars in food samples by liquid chromatography. *Microchem. J.* **110**, 629–635 (2013).
161. Almeling, S., Ilko, D. & Holzgrabe, U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69**, 50–63 (2012).
162. Bleakney, W. A New Method of Positive Ray Analysis and Its Application to the Measurement of Ionization Potentials in Mercury Vapor. *Phys Rev* **34**, 157–160 (1929).
163. Nier, A. O. C., Ney, E. P. & Ingham, M. G. Adjustable Gas Leak. *Rev. Sci. Instrum.* **18**, 191–191 (1947).
164. Schröder, E. *Massenspektrometrie - Begriffe und Definitionen.* (1991).
165. Tsang, C. W. & Harrison, A. G. Chemical ionization of amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 1301–1308 (1976).
166. Herman, J. A. & Harrison, A. X. G. Effect of protonation exothermicity on the chemical ionization mass spectra of some alkylbenzenes. *Org. Mass Spectrom.* **16**, 423–427 (1981).
167. Dole, M. *et al.* Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240–2249 (1968).
168. Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **280**, 383–397 (1964).
169. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287–2294 (1976).
170. Bruins, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* **794**, 345–357 (1998).
171. Postle, A. D., Wilton, D. C., Hunt, A. N. & Attard, G. S. Probing phospholipid dynamics by electrospray ionisation mass spectrometry. *Prog. Lipid Res.* **46**, 200–224 (2007).
172. Cui, Z. & Thomas, M. J. Phospholipid profiling by tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **877**, 2709–2715 (2009).
173. Hunt, A. N. & Postle, A. D. Mass spectrometry determination of endonuclear phospholipid composition and dynamics. *Methods* **39**, 104–111 (2006).
174. Covey, T. R., Thomson, B. A. & Schneider, B. B. Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 870–897 (2009).
175. Wu, J., Liu, J. & Cai, Z. Determination of triclosan metabolites by using in-source fragmentation from high-performance liquid chromatography/negative atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 1828–1834 (2010).
176. Carrier, D. J., Eckers, C. & Wolff, J.-C. “In-source” fragmentation of an isobaric impurity of lamotrigine for its measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry after pre-concentration using solid phase extraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 731–737 (2008).
177. Tian, Q., Duncan, C. J. G. & Schwartz, S. J. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and in-source fragmentation of lutein esters. *J. Mass Spectrom.* **38**, 990–995 (2003).
178. Raffaelli, A. & Saba, A. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 318–331 (2003).

179. Hu, C. *et al.* Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *J. Chromatogr. B* **877**, 2836–2846 (2009).
180. Imbert, L. *et al.* Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani*. *J. Chromatogr. A* **1242**, 75–83 (2012).
181. Cyril, C. Développement de méthodes physico-chimiques pour le contrôle de la médication par l'Harpagophytum et l'Eleutherococcus, principes actifs utilisés en phytothérapie équine. (2006).
182. Li, D.-X., Gan, L., Bronja, A. & Schmitz, O. J. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Anal. Chim. Acta* **891**, 43–61 (2015).
183. Constapel, M. *et al.* Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **19**, 326–336 (2005).
184. Paul, W. & Steinwedel, H. Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Z. Naturforschung Teil A* **8**, 448–450 (1953).
185. Dawson, P. H., French, J. B., Buckley, J. A., Douglas, D. J. & Simmons, D. The use of triple quadrupoles for sequential mass spectrometry: 1—The instrument parameters. *Org. Mass Spectrom.* **17**, 205–211 (1982).
186. Campana, J. E. Elementary theory of the quadrupole mass filter. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **33**, 101–117 (1980).
187. Ferguson, R. E., McCulloh, K. E. & Rosenstock, H. M. Observation of the Products of Ionic Collision Processes and Ion Decomposition in a Linear, Pulsed Time-of-Flight Mass Spectrometer. *J. Chem. Phys.* **42**, 100–106 (1965).
188. Blaum, K. *et al.* Properties and performance of a quadrupole mass filter used for resonance ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **181**, 67–87 (1998).
189. Bouchoux, G. & Sablier, M. Spectrométrie de masse - Principes et appareillage. *Techniques de l'ingénieur P 2* 645-1-P 2 645-32 (2005).
190. McLafferty, F. W., Bente, P. F., Kornfeld, R., Tsai, S.-C. & Howe, I. Collisional activation spectra of organic ions. *J. Mass Spectrom.* **30**, 797–806 (1995).
191. Levsen, K. & Schwarz, H. Collisional Activation Mass Spectrometry—A New Probe for Determining the Structure of Ions in the Gas Phase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **15**, 509–519 (1976).
192. Wolff, M. M. & Stephens, W. E. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Rev. Sci. Instrum.* **24**, 616–617 (1953).
193. Wiley, W. C. & McLaren, I. H. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **26**, 1150–1157 (1955).
194. Mamyrin, B. A., Karataev, V. I., Shmikk, D. V. & Zagulin, V. A. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. J. Exp. Theor. Phys.* **37**, 45 (1973).
195. Zhang, Y. *et al.* High resolution mass spectrometry coupled with multivariate data analysis revealing plasma lipidomic alteration in ovarian cancer in Asian women. *Talanta* **150**, 88–96 (2016).
196. Choi, J. M., Kim, T.-E., Cho, J.-Y., Lee, H. J. & Jung, B. H. Development of lipidomic platform and phosphatidylcholine retention time index for lipid profiling of rosuvastatin treated human plasma. *J. Chromatogr. B* **944**, 157–165 (2014).
197. Shen, Q., Dai, Z., Huang, Y.-W. & Cheung, H.-Y. Lipidomic profiling of dried seahorses by hydrophilic interaction chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Chem.* **205**, 89–96 (2016).
198. Ribeiro, H. C. *et al.* A preliminary study of bipolar disorder type I by mass spectrometry-based serum lipidomics. *Psychiatry Res.* (2017). doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2017.08.039>
199. Miao, H. *et al.* Plasma lipidomics reveal profound perturbation of glycerophospholipids, fatty acids, and sphingolipids in diet-induced hyperlipidemia. *Chem. Biol. Interact.* **228**, 79–87 (2015).
200. Wu, S. *et al.* Lipidomic profiling reveals significant alterations in lipid biochemistry in hypothyroid rat cerebellum and the therapeutic effects of Sini decoction. *J. Ethnopharmacol.* **159**, 262–273 (2015).
201. Lin, Z. *et al.* Comparison of sepsis rats induced by caecal ligation puncture or *Staphylococcus aureus* using a LC-QTOF-MS metabolomics approach. *Infect. Genet. Evol.* **43**, 86–93 (2016).
202. Garnier, N., Rolando, C., Høtje, J. M. & Tokarski, C. Analysis of archaeological triacylglycerols by high resolution nanoESI, FT-ICR MS and IRMPD MS/MS: Application to 5th century BC–4th century AD oil lamps from Olbia (Ukraine). *Int. J. Mass Spectrom.* **284**, 47–56 (2009).
203. Holguin, F. O. & Schaub, T. Characterization of microalgal lipid feedstock by direct-infusion FT-ICR mass spectrometry. *Algal Res.* **2**, 43–50 (2013).
204. Kingdon, K. H. A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Phys. Rev.* **21**, 408–418 (1923).
205. Knight, R. D. Storage of ions from laser-produced plasmas. *Appl. Phys. Lett.* **38**, 221–223 (1981).
206. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156–1162 (2000).
207. Scigelova, M. & Makarov, A. Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics. *Proteomics* **6 Suppl 2**, 16–21 (2006).
208. Makarov, A., Denisov, E., Lange, O. & Horning, S. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 977–982 (2006).
209. Makarov, A. *et al.* Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113–2120 (2006).
210. Makarov, A. & Denisov, E. Dynamics of ions of intact proteins in the Orbitrap mass analyzer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1486–1495 (2009).

211. Makarov, A., Denisov, E. & Lange, O. Performance Evaluation of a High-field Orbitrap Mass Analyzer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1391–1396 (2009).
212. Atkinson, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework\*. *Clin Pharmacol Ther* **69**, 89–95 (2001).
213. Who Regional Office for Europe. Guiding principles for the use of biological markers in the assessment of human exposure to environmental factors: an integrative approach of epidemiology and toxicology report on a WHO consultation. *Toxicology* **101**, 1–10 (1995).
214. Jimenez, C. R., Knol, J. C., Meijer, G. A. & Fijneman, R. J. A. Proteomics of colorectal cancer: Overview of discovery studies and identification of commonly identified cancer-associated proteins and candidate CRC serum markers. *J. Proteomics* **73**, 1873–1895 (2010).
215. Biomarqueurs et produits de santé - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Available at: [http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/(offset)/0). (Accessed: 11th July 2017)
216. Alex Brown, H. Lipidomics: when apocrypha becomes canonical. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**, 221–226 (2012).
217. Navas-Iglesias, N., Carrasco-Pancorbo, A. & Cuadros-Rodríguez, L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *TrAC Trends Anal. Chem.* **28**, 393–403 (2009).
218. Ozdemir, V. *et al.* Risk Assessment and Communication Tools for Genotype Associations with Multifactorial Phenotypes: The Concept of “Edge Effect” and Cultivating an Ethical Bridge between Omics Innovations and Society. *OMICS J. Integr. Biol.* **13**, 43–61 (2009).
219. Taguchi, R. & Ishikawa, M. Precise and global identification of phospholipid molecular species by an Orbitrap mass spectrometer and automated search engine Lipid Search. *J. Chromatogr. A* **1217**, 4229–4239 (2010).
220. Kamphorst, J. J., Fan, J., Lu, W., White, E. & Rabinowitz, J. D. Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry Analysis of Fatty Acid Metabolism. *Anal. Chem.* **83**, 9114–9122 (2011).
221. Fhaner, C. J., Liu, S., Ji, H., Simpson, R. J. & Reid, G. E. Comprehensive Lipidome Profiling of Isogenic Primary and Metastatic Colon Adenocarcinoma Cell Lines. *Anal. Chem.* 121010164038005 (2012). doi:10.1021/ac302154g
222. Li, X. & Franke, A. A. Improved LC–MS Method for the Determination of Fatty Acids in Red Blood Cells by LC–Orbitrap MS. *Anal. Chem.* **83**, 3192–3198 (2011).
223. Lam, S. M. & Shui, G. Lipidomics as a Principal Tool for Advancing Biomedical Research. *J. Genet. Genomics* **40**, 375–390 (2013).
224. van Echten-Deckert, G. & Walter, J. Sphingolipids: Critical players in Alzheimer’s disease. *Prog. Lipid Res.* **51**, 378–393 (2012).
225. Norris, P. C. & Dennis, E. A. A lipidomic perspective on inflammatory macrophage eicosanoid signaling. *Adv. Biol. Regul.* **54**, 99–110 (2014).
226. Stock, J. The emerging role of lipidomics. *Atherosclerosis* **221**, 38–40 (2012).
227. Didangelos, A., Stegemann, C. & Mayr, M. The -omics era: Proteomics and lipidomics in vascular research. *Atherosclerosis* **221**, 12–17 (2012).
228. Meikle, P. J., Wong, G., Barlow, C. K. & Kingwell, B. A. Lipidomics: Potential Role in Risk Prediction and Therapeutic Monitoring for Diabetes and Cardiovascular Disease. *Pharmacol. Ther.* (2014).
229. Guan, W. *et al.* Ovarian cancer detection from metabolomic liquid chromatography/mass spectrometry data by support vector machines. *BMC Bioinformatics* **10**, 259 (2009).
230. Katajamaa, M. & Orešič, M. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics* **6**, 179 (2005).
231. Katajamaa, M. & Orešič, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr. A* **1158**, 318–328 (2007).
232. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A. & Orešič, M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **11**, 395 (2010).
233. Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L. & Orešič, M. Algorithms and tools for the preprocessing of LC–MS metabolomics data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **108**, 23–32 (2011).
234. Trevino, V. *et al.* GridMass: a fast two-dimensional feature detection method for LC/MS. *J. Mass Spectrom. JMS* **50**, 165–174 (2015).
235. Di Guida, R. *et al.* Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics* **12**, 93 (2016).
236. Kai-man Leung, A., Chau, F. & Gao, J. A review on applications of wavelet transform techniques in chemical analysis: 1989–1997. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **43**, 165–184 (1998).
237. Savitzky, A. & Golay, M. J. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* **36**, 1627–1639 (1964).
238. STEINIER, J., TERMONIA, Y. & DELTOUR, J. Comments on Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Square Procedure. *Anal. Chem.* **44**, 1909 (1972).
239. Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Deming, S. N., Michotte, Y. & Kaufman, L. *Chemometrics: a textbook.* (1988).
240. Wold, S. & Sjöström, M. Chemometrics, present and future success. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **44**, 3–14 (1998).
241. Bartel, J., Krumsiek, J. & Theis, F. J. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **4**, e201301009 (2013).

242. Carey, R. N., Wold, S. & Westgard, J. O. Principal component analysis. Alternative to referee methods in method comparison studies. *Anal. Chem.* **47**, 1824–1829 (1975).
243. Wold, S., Esbensen, K. & Geladi, P. Principal component analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **73**, 37–46 (1987).
244. Geladi, P., Isaksson, H., Lindqvist, L., Wold, S. & Esbensen, K. Principal component analysis of multivariate images. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **5**, 209–220 (1989).
245. Wold, S., Hellberg, S., Sjöström, M. & Wold, H. *PLS modeling with latent variables in two or more dimensions*. (1987).
246. Wold, S., Sjöström, M. & Eriksson, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **58**, 109–130 (2001).
247. Wold, S., Trygg, J., Berglund, A. & Antti, H. Some recent developments in PLS modeling. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **58**, 131–150 (2001).
248. van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K. & van der Werf, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* **7**, 142 (2006).
249. Worley, B. & Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* **1**, 92–107 (2013).
250. *Design of experiments: principles and applications*. (Umetrics AB, 2000).
251. Wiklund, S. *et al.* Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Anal. Chem.* **80**, 115–122 (2008).
252. Boccard, J. & Rutledge, D. N. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Anal. Chim. Acta* **769**, 30–39 (2013).
253. Imbert, L. *et al.* Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 1169–1182 (2012).
254. Wold, S., Antti, H., Lindgren, F. & Öhman, J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **44**, 175–185 (1998).
255. Cajka, T. & Fiehn, O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **61**, 192–206 (2014).
256. Lanzini, J. *et al.* Changing in lipid profile induced by the mutation of Foxn1 gene: A lipidomic analysis of Nude mice skin. *Biochimie* **118**, 234–243 (2015).
257. Goupy, J. *Les plan d'expériences*. **74**, (2006).
258. Hibbert, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B* **910**, 2–13 (2012).
259. Hecht, E. S., Oberg, A. L. & Muddiman, D. C. Optimizing Mass Spectrometry Analyses: A Tailored Review on the Utility of Design of Experiments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **27**, 767–785 (2016).
260. Sumner, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* **3**, 211–221 (2007).
261. Pulfer, M. & Murphy, R. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 332–64 (2003).
262. Murphy, R. C., Hanahan, D. J. & Murphy, R. C. *Mass spectrometry of lipids*. (Plenum Press, 1993).
263. Murphy, R. C. *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*. (Royal Society of Chemistry, 2014). doi:10.1039/9781782626350
264. Gowda, H. *et al.* Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses. *Anal. Chem.* **86**, 6931–6939 (2014).
265. Patti, G. J. *et al.* A View from Above: Cloud Plots to Visualize Global Metabolomic Data. *Anal. Chem.* **85**, 798–804 (2013).
266. Bongard, V. *et al.* Attainment of low-density lipoprotein cholesterol target in the French general population according to levels of cardiovascular risk: Insights from the MONA LISA study. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **106**, 93–102 (2013).
267. Hirayama, S. & Miida, T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta* **414**, 215–224 (2012).
268. Stein, O. & Stein, Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* **144**, 285–301 (1999).
269. Fournier, N. *et al.* Fibrate treatment induced quantitative and qualitative HDL changes associated with an increase of SR-BI cholesterol efflux capacities in rabbits. *Biochimie* **95**, 1278–1287 (2013).
270. Bellanger, N. *et al.* Functionality of postprandial larger HDL2 particles is enhanced following CETP inhibition therapy. *Atherosclerosis* **221**, 160–168 (2012).
271. Attia, N. *et al.* Impact of android overweight or obesity and insulin resistance on basal and postprandial SR-BI and ABCA1-mediated serum cholesterol efflux capacities. *Atherosclerosis* **209**, 422–429 (2010).
272. Attia, N. *et al.* Enhanced removal of cholesterol from macrophage foam cells to serum from type IV hypertriglyceridemic subjects. *Atherosclerosis* **198**, 49–56 (2008).
273. Fournier, N. *et al.* Fractional efflux and net change in cellular cholesterol content mediated by sera from mice expressing both human apolipoprotein AI and human lecithin : cholesterol acyltransferase genes. *Atherosclerosis* **147**, 227–35 (2001).
274. Fournier, N. *et al.* Fractional efflux and net change in cellular cholesterol content mediated by sera from mice expressing both human apolipoprotein AI and human lecithin: cholesterol acyltransferase genes. *Atherosclerosis* **147**, 227–235 (1999).
275. Fournier, N. *et al.* Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 303–312 (2012).
276. de Lorgeril, M. *et al.* Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet Lond. Engl.* **343**, 1454–1459 (1994).

277. Simopoulos, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **233**, 674–688 (2008).
278. Nishizaki, Y. *et al.* Significance of imbalance in the ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids in patients with acute coronary syndrome. *Am. J. Cardiol.* **113**, 441–445 (2014).
279. de Jonge, H. W., Dekkers, D. H. W. & Lamers, J. M. J. Polyunsaturated fatty acids and signalling via phospholipase C- $\beta$  and A2 in myocardium. in *Biochemistry of Signal Transduction in Myocardium* (eds. Lamers, J. M. J. & Verdouw, P. D.) 199–210 (Springer US, 1996). doi:10.1007/978-1-4613-1275-8\_25
280. Schmitz, G. & Ecker, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **47**, 147–155 (2008).
281. Kim, W. *et al.* Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Prog. Lipid Res.* **49**, 250–261 (2010).
282. Fournier, N. *et al.* Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux via a protein kinase A signaling pathway in primary human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**, 331–341 (2016).
283. Fournier, N. *et al.* Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages by reducing the cholesteryl ester mobilization from lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1079–1091 (2017).
284. *Hyphenated and alternative methods of detection in chromatography.* (CRC Press, 2012).
285. Deschamps, F. S., Baillet, A. & Chaminade, P. Mechanism of response enhancement in evaporative light scattering detection with the addition of triethylamine and formic acid. *The Analyst* **127**, 35–41 (2002).
286. Heron, S., Maloumbi, M.-G., Dreux, M., Verette, E. & Tchaplal, A. Method development for a quantitative analysis performed without any standard using an evaporative light-scattering detector. *J. Chromatogr. A* **1161**, 152–156 (2007).
287. Heron, S. *et al.* Calibration of an Evaporative Light-Scattering Detector for the Universal Quantitative Analyses in Liquid Chromatography—Application to the Determination of Triacylglycerols in Cucurbitaceous Oils. *Food Anal. Methods* **3**, 67–74 (2010).
288. Abreu, S., Solgadi, A. & Chaminade, P. Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques. *J. Chromatogr. A* **1514**, 54–71 (2017).
289. Prache, N., Abreu, S., Sassi, P., Thiébaud, D. & Chaminade, P. Alternative solvents for improving the greenness of normal phase liquid chromatography of lipid classes. *J. Chromatogr. A* **1464**, 55–63 (2016).
290. Khoury, S., El Banna, N., Tfaïli, S. & Chaminade, P. A study of inter-species ion suppression in electrospray ionization-mass spectrometry of some phospholipid classes. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 1453–1465 (2016).
291. Koivusalo, M., Haimi, P., Heikinheimo, L., Kostianinen, R. & Somerharju, P. Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. *J. Lipid Res.* **42**, 663–672 (2001).
292. Maréchal, E. *et al.* Membrane lipidomics for the discovery of new antiparasitic drug targets. *Trends Parasitol.* **27**, 496–504 (2011).
293. Coimbra, E. S. *et al.* Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2548–2555 (2010).
294. Gaudin, M. *et al.* Atmospheric Pressure Photoionization as a Powerful Tool for Large-Scale Lipidomic Studies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 869–879 (2012).
295. Pham, T. T. H., Loiseau, P. M. & Barratt, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *Int. J. Pharm.* **454**, 539–552 (2013).
296. Pham, T. T. H., Barratt, G., Michel, J. P., Loiseau, P. M. & Saint-Pierre-Chazalet, M. Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B–miltefosine-loaded nanocochleates. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **106**, 224–233 (2013).
297. Pham, T. T. H. *et al.* Development of antileishmanial lipid nanocomplexes. *Biochimie* **107**, 143–153 (2014).
298. Díaz-López, R. *et al.* The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. *Biomaterials* **31**, 1723–1731 (2010).
299. Díaz-López, R. *et al.* Phospholipid decoration of microcapsules containing perfluorooctyl bromide used as ultrasound contrast agents. *Biomaterials* **30**, 1462–1472 (2009).
300. Díaz-López, R., Libong, D., Tsapis, N., Fattal, E. & Chaminade, P. Quantification of pegylated phospholipids decorating polymeric microcapsules of perfluorooctyl bromide by reverse phase HPLC with a charged aerosol detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 702–707 (2008).
301. Essaid, D. *et al.* Artificial plasma membrane models based on lipidomic profiling. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 2725–2736 (2016).
302. Nowak, M. *et al.* Impact of polyunsaturated fatty acids on oxidized low density lipoprotein-induced U937 cell apoptosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **18**, 494–503 (2011).
303. Chauvin, B. *et al.* Plasma distribution of tetraphenylporphyrin derivatives relevant for Photodynamic Therapy: Importance and limits of hydrophobicity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **83**, 244–252 (2013).
304. Moulin, M. *et al.* Sex-specific cardiac cardiolipin remodeling after doxorubicin treatment. *Biol. Sex Differ.* **6**, 20 (2015).
305. Zhao, G.-J., Yin, K., Fu, Y.-C. & Tang, C.-K. The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Mol. Med. Camb. Mass* **18**, 149–158 (2012).

306. Larrede, S. *et al.* Stimulation of Cholesterol Efflux by LXR Agonists in Cholesterol-Loaded Human Macrophages Is ABCA1-Dependent but ABCG1-Independent. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1930–1936 (2009).
307. Olivier, M. *et al.* Human ATP-Binding Cassette G1 Controls Macrophage Lipoprotein Lipase Bioavailability and Promotes Foam Cell Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2223–2231 (2012).
308. Berkhout, T. A., Havekes, L. M., Pearce, N. J. & Groot, P. H. E. The effect of (–)-hydroxycitrate on the activity of the low-density-lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in the human hepatoma cell line Hep G2. *Biochem. J.* **272**, 181–186 (1990).
309. Grønn, M., Christensen, E., Hagve, T.-A. & Christophersen, B. O. Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n–3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n–3)) studied in isolated rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1081**, 85–91 (1991).
310. Hoving, E. B., Jansen, G., Volmer, M., Doormaal, J. J. van & Muskiet, F. A. J. Profiling of plasma cholesterol ester and triglyceride fatty acids as their methyl esters by capillary gas chromatography, preceded by a rapid aminopropyl-silica column chromatographic separation of lipid classes. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **434**, 395–409 (1988).
311. Pinkart, H. C., Devereux, R. & Chapman, P. J. Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. Disclaimer: mention of trade names or commercial products does not constitute endorsement or recommendation for use by the US Environmental Protection Agency. *J. Microbiol. Methods* **34**, 9–15 (1998).
312. Ruiz, J., Antequera, T., Andres, A. I., Petron, M. J. & Muriel, E. Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Anal. Chim. Acta* **520**, 201–205 (2004).
313. What is a Lipid? - AOCs Lipid Library. Available at: <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39371>. (Accessed: 7th June 2017)
314. LIPID MAPS Lipidomics Gateway : Home. Available at: <http://www.lipidmaps.org/>. (Accessed: 6th July 2017)
315. Spitzer, V. Structure analysis of fatty acids by gas chromatography–low resolution electron impact mass spectrometry of their 4,4-dimethylloxazoline derivatives--a review. *Prog. Lipid Res.* **35**, 387–408 (1996).
316. Introduction to Mass Spectrometry of Fatty Acids. Available at: <http://www.lipidhome.co.uk/ms/basics/introduction/index.htm>. (Accessed: 31st January 2018)
317. Christie, W. W. & Han, X. Chapter 9 - Isolation of fatty acids and identification by spectroscopic and related techniques. in *Lipid Analysis (Fourth Edition)* (eds. Christie, W. W. & Han, X.) 181–211 (Woodhead Publishing, 2012). doi:10.1533/9780857097866.181
318. Vine, J. Analysis of fatty acid methyl esters by high-resolution gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **196**, 415–424 (1980).
319. Eder, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **671**, 113–131 (1995).
320. MORRISON, W. R. & SMITH, L. M. PREPARATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS AND DIMETHYLACETALS FROM LIPIDS WITH BORON FLUORIDE--METHANOL. *J. Lipid Res.* **5**, 600–608 (1964).
321. Demirbas, A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Convers. Manag.* **49**, 125–130 (2008).
322. Lepage, G. & Roy, C. C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* **25**, 1391–1396 (1984).
323. Dodds, E. D., McCoy, M. R., Rea, L. D. & Kennish, J. M. Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. *Lipids* **40**, 419–428 (2005).
324. Visioli, F., Marangoni, F., Moi, D., Rise, P. & Galli, C. In vitro differentiation of human monocytes to macrophages results in depletion of antioxidants and increase in n-3 fatty acids levels. *FEBS Lett.* **471**, 75–77 (2000).
325. Wang, S. *et al.* In vitro fatty acid enrichment of macrophages alters inflammatory response and net cholesterol accumulation. *Br. J. Nutr.* **102**, 497–501 (2009).
326. Astudillo, A. M., Balgoma, D., Balboa, M. A. & Balsinde, J. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 249–256 (2012).
327. Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346–356 (1977).
328. *Multi- and megavariable data analysis.* (Umetrics, 2006).
329. *Basic principles and applications.* (Umetrics, 2013).
330. Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G. & Senn, H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabolomics. *Anal. Chem.* **78**, 4281–4290 (2006).
331. Nagao, K. *et al.* Enhanced ApoA-I-dependent Cholesterol Efflux by ABCA1 from Sphingomyelin-deficient Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 14868–14874 (2007).
332. Quazi, F. & Molday, R. S. Differential phospholipid substrates and directional transport by ATP-binding cassette proteins ABCA1, ABCA7, and ABCA4 and disease-causing mutants. *J. Biol. Chem.* **288**, 34414–34426 (2013).
333. Moreau, R. A. The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector. *Lipids* **41**, 727–734 (2006).
334. Iwasaki, Y., Masayama, A., Mori, A., Ikeda, C. & Nakano, H. Composition analysis of positional isomers of phosphatidylinositol by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1216**, 6077–6080 (2009).
335. Lisa, M., Lynen, F., Holcapek, M. & Sandra, P. Quantitation of triacylglycerols from plant oils using charged aerosol detection with gradient compensation. *J. Chromatogr. A* **1176**, 135–142 (2007).

336. Merle, C., Laugel, C., Chaminade, P. & Baillet-Guffroy, A. QUANTITATIVE STUDY OF THE STRATUM CORNEUM LIPID CLASSES BY NORMAL PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY: COMPARISON BETWEEN TWO UNIVERSAL DETECTORS. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **33**, 629–644 (2010).
337. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
338. van Meer, G. & de Kroon, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8 (2010).
339. Escriba, P. V. *et al.* Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog. Lipid Res.* **59**, 38–53 (2015).
340. Leventis, P. A. & Grinstein, S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 407–427 (2010).
341. Murphy, E. J., Schapiro, M. B., Rapoport, S. I. & Shetty, H. U. Phospholipid composition and levels are altered in Down syndrome brain. *Brain Res.* **867**, 9–18 (2000).
342. Schifferer, R. *et al.* ApoA-I induces a preferential efflux of monounsaturated phosphatidylcholine and medium chain sphingomyelin species from a cellular pool distinct from HDL3 mediated phospholipid efflux. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1771**, 853–863 (2007).
343. Leidl, K., Liebisch, G., Richter, D. & Schmitz, G. Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1781**, 655–664 (2008).
344. Leidl, K., Liebisch, G., Richter, D. & Schmitz, G. Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. *Chem. Phys. Lipids* **154**, S25 (2008).
345. Malavolta, M., Bocci, F., Boselli, E. & Frega, N. G. Normal phase liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of phospholipid molecular species in blood mononuclear cells: application to cystic fibrosis. *J. Chromatogr. B* **810**, 173–186 (2004).
346. Valdearcos, M. *et al.* Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 6004–6013 (2011).
347. Braverman, N. E. & Moser, A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1442–1452 (2012).
348. Wang, X., Lin, H. & Gu, Y. Multiple roles of dihomo-gamma-linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis.* **11**, 25 (2012).
349. Wallner, S. *et al.* Monocyte to macrophage differentiation goes along with modulation of the plasmalogen pattern through transcriptional regulation. *PLoS One* **9**, e94102 (2014).
350. Kita, Y., Tokuoka, S. M. & Shimizu, T. Mediator lipidomics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**, 777–781 (2017).
351. AbuMweis, S., Jew, S., Tayyem, R. & Agraib, L. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid containing supplements modulate risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis of randomised placebo-control human clinical trials. *J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc.* (2017). doi:10.1111/jhn.12493
352. Yagi, S. *et al.* n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Promising Nutrients for Preventing Cardiovascular Disease. *J. Atheroscler. Thromb.* **24**, 999–1010 (2017).
353. Kortz, L., Dorow, J. & Ceglarek, U. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of eicosanoids and related lipids in human biological matrices: a review. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **964**, 1–11 (2014).
354. Tsikas, D. Quantitative analysis of eicosanoids in biological samples by LC–MS/MS: Mission accomplished? *J. Chromatogr. B* **1012–1013**, 211–214 (2016).
355. Yasumoto, A., Tokuoka, S. M., Kita, Y., Shimizu, T. & Yatomi, Y. Multiplex quantitative analysis of eicosanoid mediators in human plasma and serum: Possible introduction into clinical testing. *J. Chromatogr. B* **1068–1069**, 98–104 (2017).
356. Hu, T., Tie, C., Wang, Z. & Zhang, J.-L. Highly sensitive and specific derivatization strategy to profile and quantitate eicosanoids by UPLC-MS/MS. *Anal. Chim. Acta* **950**, 108–118 (2017).
357. Ferreiro-Vera, C., Priego-Capote, F. & Castro, M. D. L. de. Integrated identification/confirmatory and targeted analysis of epoxyeicosatrienoic acids in human serum by LC–TOF MS and automated on-line SPE–LC–QqQ MS/MS. *Talanta* **106**, 440–447 (2013).
358. Masoodi, M., Eiden, M., Koulman, A., Spaner, D. & Volmer, D. A. Comprehensive lipidomics analysis of bioactive lipids in complex regulatory networks. *Anal. Chem.* **82**, 8176–8185 (2010).
359. Paglia, G., Kliman, M., Claude, E., Geromanos, S. & Astarita, G. Applications of ion-mobility mass spectrometry for lipid analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 4995–5007 (2015).
360. Jonasdottir, H. S. *et al.* Differential mobility separation of leukotrienes and protectins. *Anal. Chem.* **87**, 5036–5040 (2015).
361. Dunn, W. B., Wilson, I. D., Nicholls, A. W. & Broadhurst, D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. *Bioanalysis* **4**, 2249–2264 (2012).
362. Wang, W. *et al.* Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Anal. Chem.* **75**, 4818–4826 (2003).
363. Warrack, B. M. *et al.* Normalization strategies for metabolomic analysis of urine samples. *J. Chromatogr. B* **877**, 547–552 (2009).

364. Hunt, A. N. & Postle, A. D. Mass spectrometry determination of endonuclear phospholipid composition and dynamics. *Methods* **39**, 104–111 (2006).
365. Zhang, G. & Wujcik, C. E. Overcoming ionization effects through chromatography: A case study for the ESI-LC-MS/MS quantitation of a hydrophobic therapeutic agent in human serum using a stable-label internal standard. *J. Chromatogr. B* **877**, 2003–2010 (2009).
366. Niklas, J., Hollemeyer, K. & Heinzle, E. High-throughput phospholipid quantitation in mammalian cells using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry with N-trifluoroacetyl-phosphatidylethanolamine as internal standard. *Anal. Biochem.* **419**, 351–353 (2011).
367. Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Earll, M. & Wilson, I. D. A QC approach to the determination of day-to-day reproducibility and robustness of LC-MS methods for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. *Bioanalysis* **4**, 2239–2247 (2012).
368. Dunn, W. B. *et al.* Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **6**, 1060–1083 (2011).
369. Thonusin, C. *et al.* Evaluation of intensity drift correction strategies using MetaboDrift, a normalization tool for multi-batch metabolomics data. *J. Chromatogr. A* **1523**, 265–274 (2017).
370. Kirwan, J. A., Broadhurst, D. I., Davidson, R. L. & Viant, M. R. Characterising and correcting batch variation in an automated direct infusion mass spectrometry (DIMS) metabolomics workflow. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 5147–5157 (2013).
371. Filzmoser, P. & Walczak, B. What can go wrong at the data normalization step for identification of biomarkers? *J. Chromatogr. A* **1362**, 194–205 (2014).
372. Habchi, B., Alves, S., Paris, A., Rutledge, D. N. & Rathahao-Paris, E. How to really perform high throughput metabolomic analyses efficiently? *TrAC Trends Anal. Chem.* **85**, 128–139 (2016).
373. Dewaest, M. *et al.* Interest of coupling ATR-MIR spectroscopy with independent components analysis to follow starch hydrothermal transformations. *Food Hydrocoll.* **58**, 298–307 (2016).
374. Gagnebin, Y. *et al.* Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies. *Anal. Chim. Acta* **955**, 27–35 (2017).
375. Suetsugu, S., Kurisu, S. & Takenawa, T. Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiol. Rev.* **94**, 1219–1248 (2014).
376. Hamon, Y. *et al.* ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat. Cell Biol.* **2**, 399–406 (2000).
377. Chambenoit, O. *et al.* Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J. Biol. Chem.* **276**, 9955–9960 (2001).
378. Smith, J. D., Waelde, C., Horwitz, A. & Zheng, P. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in. *J. Biol. Chem.* **277**, 17797–17803 (2002).
379. D'Souza, K. & Epand, R. M. Enrichment of phosphatidylinositols with specific acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1501–1508 (2014).
380. Corda, D., Zizza, P., Varone, A., Filippi, B. M. & Mariggio, S. The glycerophosphoinositols: cellular metabolism and biological functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **66**, 3449–3467 (2009).
381. Gulshan, K. *et al.* PI(4,5)P<sub>2</sub> Is Translocated by ABCA1 to the Cell Surface Where It Mediates Apolipoprotein A1 Binding and Nascent HDL Assembly. *Circ. Res.* **119**, 827–838 (2016).
382. Kielkowska, A. *et al.* A new approach to measuring phosphoinositides in cells by mass spectrometry. *Adv. Biol. Regul.* **54**, 131–141 (2014).
383. Bernheim, F. & Bernheim, M. L. C. ACTION OF VANADIUM ON TISSUE OXIDATIONS. *Science* **88**, 481–482 (1938).
384. Greig, F. H., Kennedy, S. & Spickett, C. M. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 266–280 (2012).
385. Weismann, D. & Binder, C. J. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 2465–2475 (2012).
386. Mattila, J.-P., Sabatini, K. & Kinnunen, P. K. J. Oxidized phospholipids as potential molecular targets for antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 2041–2050 (2008).
387. O'Donnell, V. B. & Murphy, R. C. New families of bioactive oxidized phospholipids generated by immune cells: identification and signaling actions. *Blood* **120**, 1985–1992 (2012).
388. Clark, S. R. *et al.* Esterified eicosanoids are acutely generated by 5-lipoxygenase in primary human neutrophils and in human and murine infection. *Blood* **117**, 2033–2043 (2011).
389. Morgan, A. H. *et al.* Quantitative assays for esterified oxylipins generated by immune cells. *Nat. Protoc.* **5**, 1919–1931 (2010).
390. Subbanagounder, G. *et al.* Epoxyisoprostane and Epoxycyclopentenone Phospholipids Regulate Monocyte Chemotactic Protein-1 and Interleukin-8 Synthesis: FORMATION OF THESE OXIDIZED PHOSPHOLIPIDS IN RESPONSE TO INTERLEUKIN-1 $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **277**, 7271–7281 (2002).
391. Reis, A. Oxidative Phospholipidomics in health and disease: Achievements, challenges and hopes. *Free Radic. Biol. Med.* **111**, 25–37 (2017).
392. Yin, H., Xu, L. & Porter, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem. Rev.* **111**, 5944–5972 (2011).

393. Spickett, C. M. & Pitt, A. R. Oxidative Lipidomics Coming of Age: Advances in Analysis of Oxidized Phospholipids in Physiology and Pathology. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 1646–1666 (2015).
394. Bochkov, V. *et al.* Pleiotropic effects of oxidized phospholipids. *Free Radic. Biol. Med.* **111**, 6–24 (2017).
395. Davies, S. S. & Guo, L. Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* **181**, 1–33 (2014).
396. Catalá, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* **157**, 1–11 (2009).
397. Usatyuk, P. V. & Natarajan, V. Hydroxyalkenals and oxidized phospholipids modulation of endothelial cytoskeleton, focal adhesion and adherens junction proteins in regulating endothelial barrier function. *Microvasc. Res.* **83**, 45–55 (2012).
398. Spickett, C. M. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol.* **1**, 145–152 (2013).
399. Sousa, B. C., Pitt, A. R. & Spickett, C. M. Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds. *Free Radic. Biol. Med.* **111**, 294–308 (2017).
400. Chen, X., Zhang, W., Laird, J., Hazen, S. L. & Salomon, R. G. Polyunsaturated phospholipids promote the oxidation and fragmentation of  $\gamma$ -hydroxyalkenals: formation and reactions of oxidatively truncated ether phospholipids. *J. Lipid Res.* **49**, 832–846 (2008).
401. Kansanen, E., Jyrkkänen, H.-K. & Levonen, A.-L. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 973–982 (2012).
402. Spickett, C. M. Chlorinated lipids and fatty acids: An emerging role in pathology. *Pharmacol. Ther.* **115**, 400–409 (2007).
403. Jerlich, A., Pitt, A. R., Schaur, R. J. & Spickett, C. M. Pathways of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL detected by LC-MS. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 673–682 (2000).
404. Melo, T. *et al.* Characterization of phospholipid nitroxidation by LC-MS in biomimetic models and in H9c2 Myoblast using a lipidomic approach. *Free Radic. Biol. Med.* **106**, 219–227 (2017).
405. Megli, F. M. & Russo, L. Different oxidized phospholipid molecules unequally affect bilayer packing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 143–152 (2008).
406. Cwiklik, L. & Jungwirth, P. Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration. *Chem. Phys. Lett.* **486**, 99–103 (2010).
407. Kar, S., Tillu, V. A., Meena, S. C. & Pande, A. H. Closely related oxidized phospholipids differentially modulate the physicochemical properties of lipid particles. *Chem. Phys. Lipids* **164**, 54–61 (2011).
408. Kinnunen, P. K. J., Kaarniranta, K. & Mahalka, A. K. Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: From biophysics to clinical correlations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 2446–2455 (2012).
409. Itabe, H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* **37**, 181–207 (1998).
410. Berliner, J. Evidence for a Role of Phospholipid Oxidation Products in Atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 142–147 (2001).
411. Jessup, W., Wilson, P., Gaus, K. & Kritharides, L. Oxidized lipoproteins and macrophages. *Vascul. Pharmacol.* **38**, 239–248 (2002).
412. Pégorier, S., Stengel, D., Durand, H., Croset, M. & Ninio, E. Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. *Atherosclerosis* **188**, 433–443 (2006).
413. Fruhwirth, G. O., Loidl, A. & Hermetter, A. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1772**, 718–736 (2007).
414. Fu, P. & Birukov, K. G. Oxidized phospholipids in control of inflammation and endothelial barrier. *Transl. Res.* **153**, 166–176 (2009).
415. Fraley, A. E. *et al.* Relationship of Oxidized Phospholipids and Biomarkers of Oxidized Low-Density Lipoprotein With Cardiovascular Risk Factors, Inflammatory Biomarkers, and Effect of Statin Therapy in Patients With Acute Coronary Syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 2186–2196 (2009).
416. Fefer, P. *et al.* The role of oxidized phospholipids, lipoprotein (a) and biomarkers of oxidized lipoproteins in chronically occluded coronary arteries in sudden cardiac death and following successful percutaneous revascularization. *Cardiovasc. Revasc. Med.* **13**, 11–19 (2012).
417. Leibundgut, G. *et al.* Oxidized Phospholipids Are Present on Plasminogen, Affect Fibrinolysis, and Increase Following Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 1426–1437 (2012).
418. Tsimikas, S. *et al.* Pro-Inflammatory Interleukin-1 Genotypes Potentiate the Risk of Coronary Artery Disease and Cardiovascular Events Mediated by Oxidized Phospholipids and Lipoprotein(a). *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 1724–1734 (2014).
419. Salomon, R. G. Structural Identification and Cardiovascular Activities of Oxidized Phospholipids. *Circ. Res.* **111**, 930–946 (2012).
420. Capoulade, R. *et al.* Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 1236–1246 (2015).
421. Miller, Y. I. & Shyy, J. Y.-J. Context-Dependent Role of Oxidized Lipids and Lipoproteins in Inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 143–152 (2017).
422. Ashraf, M. Z., Kar, N. S. & Podrez, E. A. Oxidized phospholipids: Biomarker for cardiovascular diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1241–1244 (2009).

423. Serbulea, V., DeWeese, D. & Leitinger, N. The effect of oxidized phospholipids on phenotypic polarization and function of macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **111**, 156–168 (2017).
424. Silva, R. N. da *et al.* Evaluation of the capacity of oxidized phosphatidylserines to induce the expression of cytokines in monocytes and dendritic cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 9–15 (2012).
425. Melo, T., Maciel, E., Oliveira, M. M., Domingues, P. & Domingues, M. R. M. Study of sphingolipids oxidation by ESI tandem MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114**, 726–732 (2012).
426. Samhan-Arias, A. K. *et al.* Oxidized phospholipids as biomarkers of tissue and cell damage with a focus on cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 2413–2423 (2012).
427. Nilsson, A. K. *et al.* Formation of oxidized phosphatidylinositol and 12-oxo-phytodienoic acid containing acylated phosphatidylglycerol during the hypersensitive response in Arabidopsis. *Phytochemistry* **101**, 65–75 (2014).
428. Reis, A. & Spickett, C. M. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 2374–2387 (2012).
429. Barriuso, B., Astiasarán, I. & Ansorena, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 1–15 (2013).
430. Ho, Y.-L., Chiu, J.-H., Wu, C.-Y. & Liu, M.-Y. Separation and determination of in vitro oxidized phospholipids by capillary zone electrophoresis. *Anal. Biochem.* **367**, 210–218 (2007).
431. Ramprecht, C. *et al.* Toxicity of oxidized phosphatidylcholines in cultured human melanoma cells. *Chem. Phys. Lipids* **189**, 39–47 (2015).
432. Spickett, C. M., Reis, A. & Pitt, A. R. Identification of oxidized phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry and LC–MS using a QQLIT instrument. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 2133–2149 (2011).
433. Fuchs, B. Mass spectrometry and inflammation—MS methods to study oxidation and enzyme-induced changes of phospholipids. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 1291–1306 (2014).
434. O'Donnell, V. B. Mass spectrometry analysis of oxidized phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1811**, 818–826 (2011).
435. Domingues, M. R. M., Reis, A. & Domingues, P. Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* **156**, 1–12 (2008).
436. Tyurina, Y. Y. *et al.* Characterization of cardiolipins and their oxidation products by LC–MS analysis. *Chem. Phys. Lipids* **179**, 3–10 (2014).
437. Zschörnig, K. & Schiller, J. A simple method to generate oxidized phosphatidylcholines in amounts close to one milligram. *Chem. Phys. Lipids* **184**, 30–37 (2014).
438. Spickett, C. M. & Dever, G. Studies of phospholipid oxidation by electrospray mass spectrometry: From analysis in cells to biological effects. *BioFactors* **24**, 17–31 (2005).
439. Khaselev, N. & Murphy, R. C. Structural characterization of oxidized phospholipid products derived from arachidonate-containing plasmenyl glycerophosphocholine. *J. Lipid Res.* **41**, 564–572 (2000).
440. Hui, S.-P., Chiba, H., Jin, S., Nagasaka, H. & Kurosawa, T. Analyses for phosphatidylcholine hydroperoxides by LC/MS. *J. Chromatogr. B* **878**, 1677–1682 (2010).
441. Le Grandois, J., Marchioni, E., Ennahar, S., Giuffrida, F. & Bindler, F. Identification and kinetics of oxidized compounds from phosphatidylcholine molecular species. *Food Chem.* **119**, 1233–1238 (2010).
442. Maciel, E., da Silva, R. N., Simões, C., Domingues, P. & Domingues, M. R. M. Structural Characterization of Oxidized Glycerophosphatidylserine: Evidence of Polar Head Oxidation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1804–1814 (2011).
443. Gruber, F., Bicker, W., Oskolkova, O. V., Tschachler, E. & Bochkov, V. N. A simplified procedure for semi-targeted lipidomic analysis of oxidized phosphatidylcholines induced by UVA irradiation. *J. Lipid Res.* **53**, 1232–1242 (2012).
444. Watson, A. D. *et al.* Structural Identification of a Novel Pro-inflammatory Epoxyisoprostane Phospholipid in Mildly Oxidized Low Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **274**, 24787–24798 (1999).
445. Reis, A., Domingues, P. & Domingues, M. R. M. Structural motifs in primary oxidation products of palmitoyl-arachidonoyl-phosphatidylcholines by LC-MS/MS: Structural motifs in OxPAPC. *J. Mass Spectrom.* **48**, 1207–1216 (2013).
446. Spickett, C. M. *et al.* Detection of phospholipid oxidation in oxidatively stressed cells by reversed-phase HPLC coupled with positive-ionization electrospray MS. *Biochem. J.* **355**, 449–457 (2001).
447. Lee, J. Y., Lim, S., Park, S. & Moon, M. H. Characterization of oxidized phospholipids in oxidatively modified low density lipoproteins by nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1288**, 54–62 (2013).
448. Almstrand, A.-C., Voelker, D. & Murphy, R. C. Identification of oxidized phospholipids in bronchoalveolar lavage exposed to low ozone levels using multivariate analysis. *Anal. Biochem.* **474**, 50–58 (2015).
449. Tyurin, V. A. *et al.* Specificity of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 toward Oxidized Phosphatidylserines: Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry Characterization of Products and Computer Modeling of Interactions. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 9736–9750 (2012).
450. Jónasdóttir, H. S. *et al.* Detection and Structural Elucidation of Esterified Oxylipids in Human Synovial Fluid by Electrospray Ionization-Fourier Transform Ion-Cyclotron Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Ion Trap-MS<sup>3</sup>: Detection of Esterified Hydroxylated Docosapentaenoic Acid Containing Phospholipids. *Anal. Chem.* **85**, 6003–6010 (2013).
451. Losito, I. *et al.* Hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry of a complex mixture of native and oxidized phospholipids. *J. Chromatogr. A* **1422**, 194–205 (2015).





**Titre :** Analyses de macrophages : de la lipidomique à l'oxylipidomique

**Mots clés :** Lipidomique, Macrophages, Analyses multivariées

**Résumé :** L'athérosclérose est un phénomène inflammatoire caractérisé par un dépôt sur les artères de macrophages gorgés de cholestérol également appelés cellules spumeuses. Actuellement, trois principales molécules membranaires sont décrites comme assurant la sortie du cholestérol libre, dont l'ABCA1 (ATP Binding Cassette A1) qui joue un rôle physiologique important.

Le but de ce travail est d'étudier l'impact de l'incorporation d'acides gras  $\omega 3$  et celui de LDL modifiées sur la composition des phospholipides membranaires et d'établir des liens entre la modification de composition des phospholipides et l'altération du fonctionnement de l'ABCA1. Une étude lipidomique a été menée, en utilisant des méthodes de chromatographie couplées à la spectrométrie de masse. Les analyses ont été réalisées au moyen d'un système de chromatographie liquide en phase normale (NP-LC) permettant la séparation des différents phospholipides. La détection a été réalisée à l'aide de

spectromètres de masse (MS) basse et ultra-haute résolution, ainsi que d'un détecteur à aérosol chargé. La chromatographie en phase gazeuse permet de connaître les proportions relatives d'acides gras. Ces techniques ont été utilisées pour réaliser une étude sur les paramètres de prétraitement (en amont du traitement des signaux analytiques), de décrire le lipidome de différents types de macrophages et d'établir les modifications de composition des phospholipides lors d'ajout chronique d'acides gras  $\omega 3$  et/ou de LDL modifiées.

Les résultats obtenus ont permis de définir une méthode de prétraitement de données LC-MS, d'évaluer la composition de trois types de macrophages et de modéliser les variations de l'efflux du cholestérol avec les modifications phospholipidiques observées pour les macrophages non spumeux. A partir de ces éléments, des thématiques communes, chimie biologie, ont pu aussi être identifiées comme l'analyse de « l'oxylipidome ».

**Title :** Macrophages analysis : from lipidomic to oxylipidomic

**Keywords :** Lipidomic, Macrophages, Multivariate analysis

**Abstract:** Atherosclerosis is an inflammatory disease characterized by a deposit on the arteries of macrophages full of cholesterol also called foam cells. Currently, three main membrane molecules are described as ensuring the release of free cholesterol, of which ABCA1 (ATP Binding Cassette A1) plays an important physiological role.

The purpose of this work is to study the impact of the incorporation of  $\omega 3$  fatty acids and modified LDL on membrane phospholipids composition and to establish the relationship between modification of the phospholipid composition and functionality of ABCA1. A lipidomic study was conducted using chromatographic methods coupled with mass spectrometry. Analyzes were carried out using normal phase liquid chromatography (NP-LC) allowing the separation of the different phospholipid

classes. Detection was performed using low and ultra-high resolution mass spectrometers (MS) and a charged aerosol detector. Gas chromatography is used to determine fatty acids proportions. These techniques were used to study pretreatment parameters, to describe different macrophages lipidome and to establish phospholipid modifications during  $\omega 3$  fatty acids chronic addition and / or modified LDL.

The results obtained made it possible to define a method for LC-MS data pretreatment, to evaluate the composition of three types of macrophages, to model the variations of cholesterol efflux with the phospholipid modifications observed for non-foamy macrophages. From these elements, common themes, chemistry biology, could also be identified as the analysis of "oxylipidome".