



**HAL**  
open science

# Approches biochimique, épidémiologique et clinique du métabolisme intégré de la Lipoprotéine (a)

Valentin Blanchard

► **To cite this version:**

Valentin Blanchard. Approches biochimique, épidémiologique et clinique du métabolisme intégré de la Lipoprotéine (a). Santé. Université de la Réunion; University of Western Australia, 2020. Français. NNT : 2020LARE0007 . tel-02941333

**HAL Id: tel-02941333**

**<https://theses.hal.science/tel-02941333>**

Submitted on 17 Sep 2020

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

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

# Thèse de Doctorat

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université de La Réunion*

*Ecole doctorale  
Science, Technologies et Santé*

*Discipline  
Biologie Santé, Biochimie*

*Unité de Recherche  
INSERM UMR1188 Diabète athérombose thérapies Réunion Océan  
Indien*

## Approches biochimique, épidémiologique et clinique du métabolisme intégré de la Lipoprotéine (a)

*Présentée et soutenue publiquement le mercredi 17 juin 2020 par*

***Valentin BLANCHARD***

### ***Jury***

***Marie-Paule GONTHIER***, Pr, Université de La Réunion, UMR1188

***Présidente***

***Mathilde VARRET***, CR (HDR), INSERM U1148 LVTS

***Rapporteur***

***Laurent MARTINEZ***, DR2, INSERM U1048 I2MC

***Rapporteur***

***Aurélié THEDREZ***, IGR, INSERM UMR1087/CNRS UMR6291

***Examineur***

***Mikaël CROYAL***, IGR, CRNH Nantes

***Encadrant***

***Gilles LAMBERT***, Pr, Université de La Réunion, UMR1188

***Directeur de thèse***



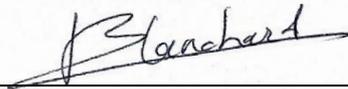
**POLE RECHERCHE**  
Ecoles Doctorales

### LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Valentin Blanchard, en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint Denis, le 18/05/2020.

Signature :



**Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion**

(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

**Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat**

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

**La contrefaçon et le faux**

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335\_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

**Le plagiat** est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.



*A mes proches...*



# Remerciements

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance envers mon directeur de thèse, le Professeur Gilles LAMBERT. Vos qualités pédagogiques et scientifiques ont été essentielles dans la réussite de cette thèse. Vous avez fait en sorte que nous puissions nous épanouir professionnellement, notamment en nous offrant l'opportunité de présenter nos travaux dans de grands congrès internationaux à Lisbonne et à New York. Je n'oublierai évidemment pas le temps et l'énergie que vous avez dépensés - le soir très tard, le weekend également - à la correction de mes écrits et à la préparation de mes oraux.*

*Un immense merci au Docteur Mikaël CROYAL pour son encadrement exceptionnel, sa disponibilité quotidienne, sa confiance, son soutien, et ce, depuis le début de mon stage de Master 2. Je te serai éternellement reconnaissant. Je remercie également le Professeur Gerald WATTS pour son encadrement de qualité et les précieux conseils qu'il m'a donnés.*

*Je voudrais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce rapport de thèse et ce malgré leur charge de travail déjà très conséquente. Merci au Professeur Marie-Paule GONTHIER présidente du jury, aux Docteurs Mathilde VARRET et Laurent MARTINEZ, rapporteurs, et au Docteur Aurélie THEDREZ, examinatrice.*

*Je remercie chaleureusement les membres de mon comité de thèse, les Docteurs Jean-Loup BASCANDS, Wildriss VIRANAICKEN et Gilles GADEA pour leur bienveillance et pour les échanges très instructifs que nous avons eus.*

*J'exprime également mes remerciements les plus sincères au Docteur Olivier MEILHAC, Directeur de l'UMR INSERM DeTROU U1188, pour m'avoir accueilli au sein de son unité ainsi que pour le temps et la confiance qu'il m'a accordés.*

*J'adresse mes remerciements aux Professeurs Bertrand CARIOU, Michel KREMPF et Samy HADJADJ pour leur grand professionnalisme et leur gentillesse. Merci pour vos précieux conseils, notamment au sujet de mon avenir professionnel. Merci également à l'équipe du WP2 du RHU CHOPIN constituée de Cédric, Damien, Karim, Méryl, Wieneke, Amandine, Matthieu et Etienne, pour tous les échanges scientifiques de grande qualité que nous avons partagés.*

*Je dois aussi la réussite de cette thèse à mes formidables collègues et amis, Stéphane, Brice, Kévin, Clément, Mathias et Ilya. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés dans une ambiance aussi excellente. Je n'oublierai pas nos fous rires et tous les moments que nous avons passés ensemble au laboratoire, comme à l'extérieur. Merci pour tout les ti z... !*

*Un immense merci à mes nantaises préférées, Audrey, Stéphanie et Manon pour leurs encouragements, leur enthousiasme, leurs joies de vivre... Vous avez été essentielles dans mon épanouissement professionnel à Nantes, comme à La Réunion.*

*J'associe également à ces remerciements l'ensemble de nos collaborateurs avec qui nous avons pu réaliser des travaux de recherche de très grande qualité : Stefan COASSIN et Claudia LAMINA (Autriche), David MARAIS et Dirk BLOM (Afrique du Sud), Tim HOLLSTEIN, Ursula KASSNER et Elisabeth STEINHAGEN-THIESSEN (Allemagne).*

*Je souhaite remercier toutes les personnes exceptionnelles que j'ai rencontrées à l'UMR DeTROI et plus globalement à la Plateforme du Cyroi. En particulier Angélique, Mathieu, Nico, Bryan, Chloé, Janice, Pierre, Eloïse, Sarah, Steeve, Ali, Philippe, Jess, Cynthia, Sandhya, Batoul, Jennifer B, Jennifer Y, Zaza, et Imade.*

*Merci La Réunion... Nar trouve...*

*Merci à tous mes ami(e)s onirissien(ne)s. En particulier Erwan et Robin qui sont venus me voir à La Réunion. Votre visite et vos encouragements m'ont vraiment fait beaucoup de bien. Merci également à la team Camélia (et Vauban) : Féfé, Bebe, Arnaud, Geo, Emma et Quentin.*

*Un très grand merci à mes ami(e)s vendéen(ne)s pour leur soutien et pour m'avoir encouragé depuis la France métropolitaine : Toto, Sasa M, Gael, Sim, Lélé, Sasa G, Louison, Mimil, Clem, Alex, sans oublier les gars de Mesnard.*

*Merci à Véronique, Hervé, Julie et Loucas Crépaud pour leurs messages de soutien, leurs encouragements et leur bonne humeur permanente.*

*Ma Mimi, je te dédie cette thèse car sans toi je n'aurais jamais pu la réaliser avec autant de réussite. Tu as été là, à mes côtés, à m'encourager, à me pousser, à me porter quotidiennement et tu as accepté les nombreux sacrifices que j'ai dus faire, le soir, le weekend... Merci du fond de mon cœur pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ces trois ans.*

*Caro et Nini, vous avez su me motiver et vous avez toujours été présentes dans les moments difficiles et ce même à 10 000 kms de distance. Je n'ai pas les mots pour vous exprimer toute ma reconnaissance mais sachez que je suis vraiment très fier de vous. Merci pour tout mes sœurs ! Je n'oublie évidemment pas les deux merveilles nées au cours de ces trois années passées, Tiago et Léni, qui m'ont, sans le savoir, apporté beaucoup de chaleur. Merci également à leur super papa, Kévin.*

*Papa et Maman, c'est à vous que j'adresse mes derniers remerciements. Si j'en suis arrivé là aujourd'hui, c'est surtout grâce à vous. Au-delà des (très) longues études que vous m'avez financées, vous m'avez inculqué les bonnes valeurs pour réussir. Nous sommes, mes sœurs et moi, extrêmement fier de vous ! Je vous dédie également cette thèse avec beaucoup d'émotion.*

# Table des matières

---

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>16</b>
<b>PRODUCTION SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>17</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>25</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>29</b>
<b>1. Le rôle central des lipoprotéines dans le transport lipidique .....</b>	<b>30</b>
1.1. Les lipoprotéines.....	30
1.1.1. Structure et fonction des lipoprotéines.....	30
1.1.2. Physiopathologie de l'athérosclérose .....	32
1.2. Le métabolisme intégré des lipoprotéines.....	33
1.2.1. La voie exogène.....	33
1.2.2. La voie endogène.....	34
1.2.3. Le transport inverse du cholestérol .....	36
1.2.4. Rôles des apolipoprotéines dans le métabolisme des lipoprotéines .....	38
1.3. L'apolipoprotéine E .....	38
1.3.1. Structure et rôle de l'apoE dans le métabolisme des lipoprotéines.....	38
1.3.2. Le polymorphisme de l'apolipoprotéine E.....	39
1.3.3. Physiopathologie de la dysbétalipoprotéïnémie .....	42
1.3.4. Le lien entre l'apoE et la lipoprotéine (a).....	43
<b>2. L'exception métabolique de la lipoprotéine (a).....</b>	<b>44</b>
2.1. Biologie de la Lp(a) .....	44
2.1.1. Découverte.....	44
2.1.2. Structure .....	44
2.1.3. Métabolisme .....	48
2.1.4. Ethnicité et Lp(a).....	53
2.2. Régulation des concentrations plasmatiques de Lp(a).....	55
2.2.1. Les facteurs de transcription hépatiques (HNFs) .....	55
2.2.2. Le polymorphisme du gène <i>LPA</i> .....	56
2.2.3. Polymorphisme de l'apolipoprotéine E et Lp(a) .....	61
2.2.4. PCSK9.....	64
2.2.5. L'influence de certaines pathologies sur les taux de Lp(a).....	65
2.2.6. Influence des facteurs environnementaux sur la Lp(a) .....	68

2.3. Lp(a) et maladies cardiovasculaires .....	70
2.3.1. Lp(a) et maladies cardiovasculaires athérosclérotiques .....	70
2.3.2. Sténose de la valve aortique .....	77
2.3.3. Mécanismes physiopathologiques .....	79
<b>3. Interventions thérapeutiques et réduction de la Lp(a) .....</b>	<b>90</b>
3.1. Les statines .....	90
3.2. Les inhibiteurs de PCSK9 .....	95
3.2.1. Les anticorps monoclonaux anti-PCSK9 .....	96
3.2.2. SiRNA anti-PCSK9 .....	99
3.3. L'impact d'autres hypolipémiants sur la Lp(a) .....	100
3.3.1. La niacine .....	100
3.3.2. Les inhibiteurs de CETP .....	101
3.3.3. Mipomersen .....	102
3.3.4. Lomitapide .....	103
3.4. Le traitement de l'hyper-Lp(a) .....	103
3.4.1. L'aphérese .....	103
3.4.2. AKCEA-APO(a)-L <sub>Rx</sub> .....	104
<b>4. Approches méthodologiques pour l'étude de la Lp(a) .....</b>	<b>107</b>
4.1. Problématique des unités de mesure de la Lp(a) .....	107
4.2. Les méthodes immunochimiques .....	107
4.3. La spectrométrie de masse .....	109
4.3.1. Préparation des échantillons pour l'analyse par LC-MS/MS .....	109
4.3.2. L'analyse LC-MS/MS .....	111
4.3.3. Flux métabolomiques et isotopes stables .....	117
4.4. Détermination du nombre de KIV .....	118
4.4.1. Le Western Blot .....	118
4.4.2. Les approches génétiques .....	119
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>121</b>
<b>TRAVAUX PERSONNELS .....</b>	<b>125</b>
<b>Article 1</b> : A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins .....	127
<b>Article 2</b> : Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study .....	165
<b>Article 3</b> : VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein)-ApoE (Apolipoprotein E) May Influence Lp(a) (Lipoprotein [a]) Synthesis or Assembly .....	183
<b>Article 4</b> : Reduced Lipoprotein (a) associated with the apolipoprotein E2 genotype confers cardiovascular protection in familial hypercholesterolemia .....	205

<b>Article 5</b> : Recurrent coronary syndromes in a patient with isolated very-high lipoprotein (a) and the prothrombin genetic variant rs1799963 (G20210A): a case report .....	213
<b>Article 6</b> : The size of apolipoprotein (a) is an independent determinant of the reduction in Lipoprotein (a) by PCSK9 inhibitors.....	221
<b>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION .....</b>	<b>255</b>
Discussion générale.....	256
Conclusion générale .....	268
<b>REFERENCES .....</b>	<b>269</b>
<b>REVUES ET TRAVAUX COLLABORATIFS .....</b>	<b>311</b>
Revues .....	312
Travaux collaboratifs.....	314



# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> – Manifestation clinique d’une hyper-Lp(a).....	27
<b>Figure 2</b> – Représentation schématique d'une lipoprotéine.....	30
<b>Figure 3</b> – Voie exogène.....	34
<b>Figure 4</b> – Voie endogène.....	35
<b>Figure 5</b> – Transport inverse du cholestérol.....	37
<b>Figure 6</b> – Représentation linéaire de l’apoE3 et des mutations ponctuelles correspondant à l’apoE2 et à l’apoE4.....	40
<b>Figure 7</b> – Affinité des isoformes de l’apoE sur le LDLR et sur le LRP.....	42
<b>Figure 8</b> – Représentation schématique de la lipoprotéine (a).....	45
<b>Figure 9</b> – Voie d'activation du plasminogène en plasmine par le t-PA ou l’u-PA.....	46
<b>Figure 10</b> - Homologie structurale du plasminogène et de l'apo(a).....	46
<b>Figure 11</b> – Structure du gène <i>LPA</i> avec une ou six répétitions <i>KIV-2</i> .....	47
<b>Figure 12</b> – Epidémiologie de la Lp(a) dans le monde.....	54
<b>Figure 13</b> – Inhibition de la biosynthèse d’apo(a) par les acides biliaires et FXR.....	56
<b>Figure 14</b> – Association entre le nombre de répétitions de <i>KIV</i> du gène <i>LPA</i> et les concentrations de Lp(a).....	57
<b>Figure 15</b> – Variation des niveaux de Lp(a) chez 431 239 individus (méta-analyse) en fonction du génotype <i>APOE</i> .....	62
<b>Figure 16</b> – Variation des niveaux de Lp(a) chez 46 615 Danois en fonction du génotype <i>APOE</i> .....	63
<b>Figure 17</b> – Risque de diabète de type 2 en fonction des concentrations de Lp(a).....	67
<b>Figure 18</b> – Risque relatif de maladie coronarienne en fonction de la concentration en Lp(a) et des deux SNPs rs10455872 et rs3798220 du gène <i>LPA</i> .....	71
<b>Figure 19</b> – (A) : Risque relatif d’infarctus du myocarde en fonction des niveaux de Lp(a). (B) : Fréquence de distribution des taux de Lp(a) dans une population de 532 359 individus.....	72

<b>Figure 20</b> – Effet de la réduction absolue de Lp(a) par les inhibiteurs de PCSK9 sur le risque de maladies coronariennes .....	74
<b>Figure 21</b> – Impact de la réduction d’origine génétique de la Lp(a) sur le risque de certaines maladies cardiovasculaires et d’insuffisance cardiaque et rénale chroniques.....	75
<b>Figure 22</b> – Taux de survie cardiovasculaire de patients atteints d’hypercholestérolémie familiale en fonction des concentrations plasmatiques de Lp(a) et du sexe .....	76
<b>Figure 23</b> – Stades de progression de la sténose de la valve aortique.....	77
<b>Figure 24</b> – Effet de l’apo(a) sur la morphologie des cellules interstitielles des valves aortiques .....	79
<b>Figure 25</b> – Taux de survie sans événement cardiovasculaire en fonction des taux de Lp(a) et de phospholipides oxydés, et de la présence d’une mutation du gène IL1 .....	82
<b>Figure 26</b> – Mécanisme pro-inflammatoire potentiel de la Lp(a) et de ses phospholipides oxydés induisant l’augmentation de la migration monocytaire .....	83
<b>Figure 27</b> – Effet de l’apo(a) sur la migration cellulaire in vitro après une lésion.. .....	84
<b>Figure 28</b> – Activation du mécanisme induisant la propagation des cellules musculaires lisses vasculaires par l’apo(a). .....	85
<b>Figure 29</b> – Coupes histologiques de valves saines et de valves calcifiées .....	87
<b>Figure 30</b> – (A) Mécanismes pathogènes de la Lp(a). (B) Voies métaboliques principales impliquées dans les mécanismes pathogènes de la Lp(a).....	89
<b>Figure 31</b> – Schéma des mécanismes cellulaires principaux à l’origine des effets hypolipémiants des statines.....	91
<b>Figure 32</b> – Effet de différentes statines avec ou sans ezetimibe sur les taux de Lp(a) .....	92
<b>Figure 33</b> – Mécanisme potentiel des statines sur la Lp(a).. .....	94
<b>Figure 34</b> – Effet de PCSK9 sur l’expression du LDLR à la surface des cellules. ....	95
<b>Figure 35</b> – Réduction absolue et relative de la Lp(a) par les inhibiteurs de PCSK9 .....	97
<b>Figure 36</b> – Mécanisme potentiel des inhibiteurs de PCSK9 avec et sans statines sur la Lp(a).99	
<b>Figure 37</b> – Réduction relative de Lp(a) par différentes doses d’AKCEA-APO(a)-L <sub>RX</sub> au cours du temps. ....	105

<b>Figure 38</b> – Réduction relative de Lp(a) par différentes thérapies .....	106
<b>Figure 39</b> – Techniques de séparation des différentes classes de lipoprotéines.....	110
<b>Figure 40</b> – Traitements des échantillons pour l'analyse protéomique.....	111
<b>Figure 41</b> – Principe de l'électrospray en mode positif.....	113
<b>Figure 42</b> – Niveaux de résolution des spectres de masse.....	114
<b>Figure 43</b> – Fonctionnement du quadripôle. ....	115
<b>Figure 44</b> – Fonctionnement du Q-Orbitrap® .....	116
<b>Figure 45</b> – Principe de l'électrophorèse de gel en champ pulsé.....	119

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1</b> – Caractéristiques biochimiques et structurales des lipoprotéines chez l'Homme. 31	
<b>Tableau 2</b> – Potentiels récepteurs de la Lp(a). .....	53

# PRODUCTION SCIENTIFIQUE

---

## Publications des travaux personnels

- **Blanchard V\***, Hollstein T\*, Chong-Hong-Fong C, Grenkowitz T, Nativel B, Chemello K, Coassin S, Croyal M, Kassner U, Lamina C, Steinhagen-Thiessen E, Lambert G. The size of apolipoprotein (a) is an independent determinant of the reduction in Lipoprotein (a) by PCSK9 inhibitors. Soumis.
- **Blanchard V**, Garçon D, Jaunet C, Chemello K, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Garfa A, Famchon G, Torres A, Le May C, Pichelin M, Bigot-Corbel E, Lambert G, Cariou B, Hadjadj S, Krempf M, Bach-Ngohou K, Croyal M. A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins. *J Lipid Res.* **2020**. DOI : 10.1194/jlr.D120000835.
- Croyal M\*, **Blanchard V\***, Ouguerram K, Chétiveaux M, Cabioch L, Moyon T, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Bernardeau K, Le May C, Flet L, Lambert G, Hadjadj S, Cariou B, Krempf M, Nobécourt-Dupuy E. VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein)-Apo E (Apolipoprotein E) May Influence Lp(a) (Lipoprotein [a]) Synthesis or Assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2020**, 40(3): 819-829.
- Khantaline I\*, **Blanchard V\***, Viallet N, Lambert G. Recurrent coronary syndromes in a patient with isolated very-high lipoprotein (a) and the prothrombin genetic variant rs1799963 (G20210A): a case report. *Eur Heart J Case Rep.* **2019**, 3(1): ytz019.
- **Blanchard V**, Croyal M, Khantaline I, Ramin-Mangata S, Chemello K, Nativel B, Blom DJ, Marais AD, Lambert G. Reduced Lipoprotein(a) Associated With the Apolipoprotein E2 Genotype Confers Cardiovascular Protection in Familial Hypercholesterolemia. *JACC Basic Transl Sci.* **2019**, 4(3): 425-427.
- **Blanchard V**, Ramin-Mangata S, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Durand M, Chemello K, Nativel B, Flet L, Chétiveaux M, Jacobi D, Bard JM, Ouguerram K, Lambert G, Krempf M, Croyal M. Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study. *J Lipid Res.* **2018**, 59(5): 892-900.

\*Premier auteur ex-aequo

## Publications de revues

- **Blanchard V**, Khantaline I, Ramin-Mangata S, Chémello K, Nativel B, Lambert G. PCSK9: from biology to clinical applications. *Pathology*. **2019**, 51(2): 177-183.
- Ramin-Mangata S\*, **Blanchard V\***, Lambert G. Key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL lowering. *Curr Opin Lipidol*. **2018**, 29(6): 453-458.

## Publications des travaux collaboratifs

- Chemello K, Beeské S, Tran TT, **Blanchard V**, Villard E, Poirier B, Le Bail JC, Dargazanli G, Ho-Van-Guimbal S, Boulay D, Bergis O, Pruniaux MP, Croyal M, Janiak P, Guillot E, Lambert G. Lipoprotein(a) Cellular Uptake Ex Vivo and Hepatic Capture In Vivo Is Insensitive to PCSK9 Inhibition With Alirocumab. *JACC Basic Transl Sci*. 2020. 10.1016/j.jacbts.2020.03.008
- Ramin-Mangata S, Wargny M, Pichelin M, Le May C, Thédrez A, **Blanchard V**, Nativel B, Santos RD, Benseñor IM, Lotufo PA, Lambert G, Cariou B. Circulating PCSK9 levels are not associated with the conversion to type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. **2020** Jan;293:49-56. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.027.
- Croyal M, Tran TT, Blanchard RH, Le Bail JC, Villard EF, Poirier B, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Ramin-Mangata S, **Blanchard V**, Nativel B, Chemello K, Khantaline I, Thédrez A, Janiak P, Krempf M, Boixel C, Lambert G, Guillot E. PCSK9 inhibition with alirocumab reduces lipoprotein(a) levels in nonhuman primates by lowering apolipoprotein(a) production rate. *Clin Sci (Lond)*. **2018** May 31;132(10):1075-1083.
- Thédrez A, Blom DJ, Ramin-Mangata S, **Blanchard V**, Croyal M, Chemello K, Nativel B, Pichelin M, Cariou B, Bourane S, Tang L, Farnier M, Raal FJ, Lambert G. Homozygous Familial Hypercholesterolemia Patients With Identical Mutations Variably Express the LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor): Implications for the Efficacy of Evolocumab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2018** Mar;38(3):592-598.

- Croyal M, Billon-Crossouard S, Goulitquer S, Aguesse A, León L, Fall F, Chétiveaux M, Moyon T, **Blanchard V**, Ouguerram K, Lambert G, Nobécourt E, Krempf M. Stable Isotope Kinetic Study of ApoM (Apolipoprotein M). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2018**, 38(1): 255-261.

### **Communications par Posters lors de congrès**

- **American Heart Association (AHA), Philadelphie, Etats-Unis, 16-18 novembre 2019.** “Detrimental Genetic Environment Resulting In Extreme Lipoprotein (a) Levels And Premature CHD In A French Family ». **Blanchard V**, Lambert G.
- **American Heart Association (AHA), Philadelphie, Etats-Unis, 16-18 novembre 2019.** “Reduced Lipoprotein(a) Associated With the Apolipoprotein E2 Genotype Confers Cardiovascular Protection in Familial Hypercholesterolemia ». **Blanchard V**, Croyal M, Lambert G.
- **European Atherosclerosis Society (EAS), Lisbonne, Portugal, 5-8 mai 2018.** “Apolipoprotein E2 (apoE2) is associated with reduced Lipoprotein (a) [Lp(a)] in patients with familial hypercholesterolemia (FH)”. **Blanchard V**, Croyal M, Blom D, Marais D, Lambert G.
- **Nouvelle Société Française d'Arthérosclérose (NSFA), Biarritz, France, 21-23 juin 2017.** “Quantitative analysis of apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS in plasma from patients with familial hypercholesterolemia”. **Blanchard V**, Croyal M, Leon L, Marais D, Krempf M, Lambert G.



## LISTE DES ABREVIATIONS

---

ABCA1 :	ATP-binding cassette A1
ABL :	Abêtalipoprotéinémie
ACAT :	Acyl-CoA cholesterol acyltransferase
Apo :	Apolipoprotéine
ADN/ARN :	Acide désoxyribonucléique/Acide ribonucléique
ASGPR :	<i>Asialoglycoprotein receptor</i>
ASO :	Oligonucléotide antisens
BMP2 :	Protéine morphogénétique osseuse, <i>Bone morphogenetic protein 2</i>
CD :	<i>Cluster of differentiation</i>
CE :	Cholestérol estérifié
CETP :	Protéine de transfert des esters de cholestérol, <i>Cholesterylester transfer protein</i>
CL :	Cholestérol libre
CM :	Chylomicrons
CRP :	Protéine C-réactive, <i>C-reactive protein</i>
CT-scan :	<i>Computerized tomography scan</i>
Da :	Daltons
EGF-A :	<i>Epidermal Growth Factor precursors homology domain A</i>
ELISA :	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELK-1 :	<i>ETS domain-containing protein Elk-1</i>
ERK 1/2 :	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ESI :	Ionisation par électrospray, <i>Electrospray ionization</i>
ETS :	<i>E twenty-six protein</i>
FAK :	<i>Focal adhesion kinase</i>
FATP4 :	<i>Fatty acid transport protein 4</i>

FGF-19 :	Facteur de croissance des fibroblastes, <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR 4 :	<i>Fibroblast growth factor receptor 4</i>
FH :	Hypercholestérolémie familiale, <i>familial hypercholesterolemia</i>
FXR :	<i>Farnesoid X receptor</i>
GalNAc :	N-acétylgalactosamine
GOF :	Gain de fonction, <i>Gain of function</i>
GSK3 $\beta$ :	<i>Glycogen synthase kinase 3 <math>\beta</math></i>
GWAS :	Etude d'association pangénomique, <i>Genome Wide Association Studies</i>
HBL :	Hypobétalipoprotéïnémie
HDL :	Lipoprotéine de haute densité, <i>High-density lipoprotein</i>
HDL-C :	HDL cholestérol
HL :	Lipase hépatique, <i>Hepatic lipase</i>
HMG-CoA :	Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A
HNF-1/4 $\alpha$ :	Facteur nucléaire des hépatocytes 1/4 alpha, <i>Hepatocyte Nuclear Factor 1/4 alpha</i>
HSPG :	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i>
ICAM-1 :	Molécule d'adhésion intercellulaire 1, <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IDL :	Lipoprotéine de densité intermédiaire, <i>Intermediate-density lipoprotein</i>
IFCC :	Fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire, <i>International federation of clinical chemistry and laboratory medicine</i>
IL :	Interleukine
KIV :	Kringle IV
KO :	<i>Knock out</i>
KV :	Kringle V
LCAT :	Lécithine-cholestérol-acyltransférase

LC-MS/MS :	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, <i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LDL :	Lipoprotéine de basse densité, <i>Low-density lipoprotein</i>
LDL-C :	LDL cholestérol
LDLR :	Récepteur au LDL, <i>LDL receptor</i>
LRP1/2 :	Protéine liée au LDLR 1/2, <i>LDLR-related protein 1/2</i>
LOF :	Perte de fonction, <i>Loss of function</i>
LPL :	Lipoprotéine lipase
Lp(a) :	Lipoprotéine (a)
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK :	<i>Mitogen-activated extracellular-signal-regulated kinase</i>
MCP-1 :	Protéine chimio-attractante des monocytes 1, <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MTTP :	Protéine intramicrosomale de transfert des triglycérides, <i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
MRM :	<i>Multiple reaction monitoring</i>
NF-κB :	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NPC1L1 :	<i>Niemann-Pick C1-like 1</i>
OMS :	Organisation mondiale de la santé
OxPL :	Phospholipides oxydés, <i>Oxidized phospholipids</i>
PAF :	Facteur d'activation plaquettaire, <i>Platelet-activating factor</i>
PAF-AH :	<i>Platelet activating factor acetylhydrolase</i>
PAR-1 :	<i>Protease-activated receptor-1</i>
PCSK9 :	<i>Proprotein convertase subtilisin kexin type 9</i>
PFGE :	Electrophorèse sur gel en champ pulsé, <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PFKFB :	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase
PKB :	<i>Protein kinase B</i>

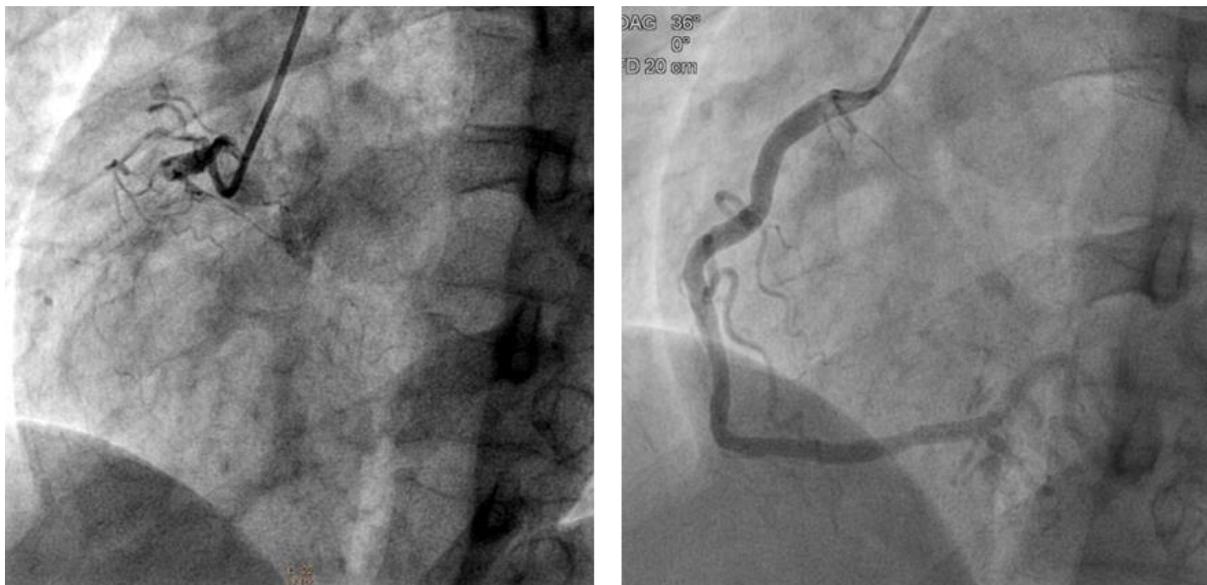
PL :	Phospholipide
PlgRKT :	<i>Plasminogen receptor KT</i>
PON1 :	<i>Paraoxonase/arylesterase 1</i>
Q, QqQ :	Analyseur quadripolaire, triple quadripôle
RhoK :	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RISC :	<i>RNA-induced silencing complex</i>
SDS :	Dodécylsulfate de sodium, <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS PAGE :	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, <i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SERPINA1 :	<i>Serpin family A member 1</i>
SiRNA :	Petit ARN interférent, <i>Small interfering RNA</i>
SMC :	Cellule musculaire lisse, <i>Smooth muscle cells</i>
SNP :	Polymorphisme d'un seul nucleotide, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SREBP2 :	<i>Sterol response element binding protein 2</i>
SR-B1 :	Récepteur scavenger B1, <i>Scavenger Receptor class B type 1</i>
TG :	Triglycéride
TGF- $\beta$ 1 :	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
TLR :	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF- $\alpha$ :	Facteur de nécrose tumorale alpha, <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TOF :	Temps de vol, <i>Time of flight</i>
t-PA :	Activateur tissulaire du plasminogène, <i>Tissue plasminogen activator</i>
u-PA :	Activateur du plasminogène de type urokinase, <i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
VCAM-1 :	Molécule-1 d'adhérence des cellules vasculaires, <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLDL :	Lipoprotéine de très basse densité, <i>Very low-density lipoprotein</i>
VLDL :	Récepteur au VLDL, <i>VLDL receptor</i>

# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**



La lipoprotéine (a) [Lp(a)] est une lipoprotéine hautement athérogène ressemblant aux lipoprotéines de basse densité (LDL). Elle est associée de façon causale et indépendante à l'apparition de maladies cardiovasculaires et de sténoses de la valve aortique. Les études physiopathologiques, épidémiologiques et génétiques démontrent que des niveaux élevés de Lp(a) circulante augmentent la fréquence des complications cardiovasculaires. Par ailleurs, environ 20% de la population présente des niveaux de Lp(a) supérieurs au seuil de risque cardiovasculaire évalué entre 75 et 125 nmol/L (~30 à 50 mg/dL). Enfin, 7 à 8% des infarctus du myocarde et 15% des sténoses de la valve aortique sont causalement associés à des taux élevés de Lp(a) (**Figure 1**).



**Figure 1** – Manifestation clinique d'une hyper-Lp(a) ([Khantaline et al., 2019](#)). Cette image montre l'artère coronaire droite avant et après angioplastie et pose de stent sur un patient de 32 ans sans facteur de risque cardiovasculaire apparent mais présentant des niveaux de Lp(a) de 244 mg/dL (~610 nmol/L).

La particularité structurelle de la Lp(a) est la présence d'une protéine caractéristique, l'apolipoprotéine (a) [apo(a)], liée à l'apolipoprotéine B100 (apoB100) d'une particule de LDL. L'apo(a) est codée par le gène *LPA* et se distingue par un polymorphisme de taille extrêmement variable car elle contient de 1 à plus de 40 répétitions du domaine Kringle IV<sub>2</sub> (KIV<sub>2</sub>). Ceci confère à cette protéine un poids moléculaire pouvant varier de 300 à plus de 800 kDa.

Les taux de Lp(a) sont principalement régulés par la génétique. En revanche, ils sont peu influencés par la plupart des traitements hypolipémiants et par les facteurs environnementaux tels que l'âge, le sexe ou l'alimentation. Le polymorphisme du gène *LPA* explique à lui seul jusqu'à 90% de la concentration sanguine en Lp(a) et les gènes *APOE* et *PCSK9* sont les seuls

facteurs génétiques qui semblent également avoir une influence notable sur ses niveaux circulants. La connaissance des mécanismes physiologiques régissant les concentrations plasmatiques en Lp(a) reste très parcellaire.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été d'étudier le rôle de la taille de l'apo(a), de l'apoE et de PCSK9 sur le métabolisme de la Lp(a) chez des patients dyslipidémiques. Pour cela, nous avons mis au point une méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose pour évaluer la taille exacte des isoformes de l'apo(a), et développé une approche par spectrométrie de masse pour doser les apolipoprotéines, déterminer leur polymorphisme et en évaluer les flux métaboliques dans des protocoles utilisant des traceurs enrichis en isotopes stables.

**ETUDE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

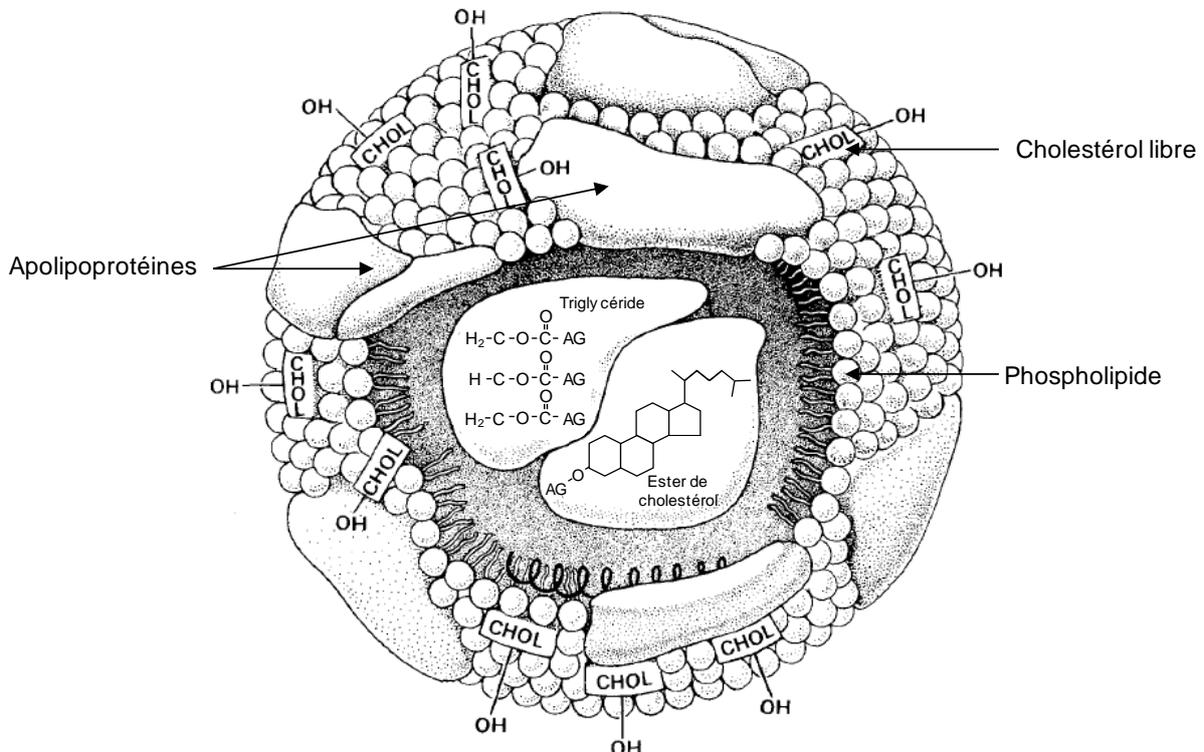
# 1. Le rôle central des lipoprotéines dans le transport lipidique

## 1.1. Les lipoprotéines

Les propriétés hydrophobes des lipides ne leur permettent pas de circuler librement dans les milieux biologiques aqueux tels que le sang, la lymphe ou le liquide interstitiel. Les lipides vont alors se complexer à des protéines amphiphiles appelées apolipoprotéines pour former des complexes macromoléculaires stables et hydrosolubles : les lipoprotéines.

### 1.1.1. Structure et fonction des lipoprotéines

Chaque particule lipoprotéique possède un noyau hydrophobe constitué de lipides apolaires tels que le cholestérol sous sa forme estérifiée et les triglycérides. Ce noyau est enveloppé d'une monocouche de phospholipides contenant des molécules de cholestérol non-estérifié et des apolipoprotéines (Brewer, 1981). L'orientation des têtes polaires des phospholipides et du cholestérol non-estérifié vers l'environnement externe, l'orientation de leurs queues apolaires vers le noyau et la nature amphiphile des apolipoprotéines permettent de stabiliser les lipoprotéines sous forme pseudo-sphérique et de les solubiliser (Figure 2).



**Figure 2** – Représentation schématique d'une lipoprotéine (adapté de Brewer, 1981). AG : acide gras, CHOL-OH : cholestérol libre.

La proportion en lipides et en protéines des lipoprotéines est très variable. Les lipides étant beaucoup moins denses que les protéines, le ratio lipides/protéines permet de différencier les lipoprotéines en cinq types, du plus dense au moins dense : les HDL, LDL, IDL, VLDL (lipoprotéines de haute, basse, intermédiaire et très basse densité) et les chylomicrons (Havel et al., 1955). Les lipoprotéines se distinguent également par leur taille, celles de basses densités (chylomicrons, VLDL) étant beaucoup plus volumineuses. Découverte ultérieurement, la lipoprotéine (a) [Lp(a)], dont la densité se situe entre celles des HDL et des LDL, constitue la sixième famille des lipoprotéines (Fless et al., 1984; Gaubatz et al., 1987; Maranhão et al., 2014). Les lipoprotéines se différencient également par leur composition en lipides. Les chylomicrons et les VLDL sont très riches en triglycérides alors que la Lp(a), les LDL et les HDL véhiculent principalement du cholestérol (libre et estérifié). Enfin, les apolipoprotéines majoritaires, l'apolipoprotéine B100 (apoB100) et l'apoA-I, permettent de classer les lipoprotéines en deux catégories : les lipoprotéines à apoB (apoB48 et apoB100) incluant les chylomicrons, VLDL, IDL, LDL et la Lp(a) et les lipoprotéines à apoA-I, c'est-à-dire les HDL (Tableau 1) (Feingold and Grunfeld, 2000).

**Tableau 1** – Caractéristiques biochimiques et structurales des lipoprotéines chez l'Homme.

Lipoprotéines	Apolipoprotéine majoritaire	Densité (g/mL)	Ratio lipides/protéines (%)	Taille (nm)	Lipides majoritaires
Chylomicrons	ApoB48	<0.930	98	75 – 1200	TG, PL
VLDL	ApoB100	0.930-1.006	90	30 - 80	TG, PL
IDL	ApoB100	1.006-1.019	83	25 – 35	TG, CE, CL, PL
LDL	ApoB100	1.019-1.063	77	18 – 25	CE, CL, PL
Lp(a)	ApoB100, apo(a)	1.05-1.12	77	~25	CE, CL, PL
HDL	ApoA-I	>1.063	58	5 - 12	CE, CL, PL

CE : cholestérol estérifié, CL : cholestérol libre, PL : phospholides, TG : triglycérides.

On considère schématiquement que les lipoprotéines à apoB ont des propriétés pro-athérogènes alors que les lipoprotéines à apoA-I (HDL) possèdent des propriétés antiathérogènes. Leurs concentrations plasmatiques corrént respectivement de manière positive et négative avec le risque cardiovasculaire (Gotto et al., 1986).

### 1.1.2. Physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie vasculaire qui se caractérise par l'accumulation progressive de cholestérol des lipoprotéines à apoB100 et de cellules inflammatoires dans l'intima des artères, conduisant à la formation de plaques d'athérome. À terme, ces plaques peuvent entraîner le durcissement de la paroi artérielle (sclérose), le rétrécissement et l'obstruction du vaisseau (sténose), ou la formation d'un thrombus lorsqu'elles se rompent. Le ralentissement puis le blocage de la circulation sanguine résulte en l'ischémie du cerveau (accident vasculaire cérébral), du cœur (infarctus), ou des membres inférieurs (artériopathie obstructive des membres inférieurs) (Tabas and Bornfeldt, 2016; Ait-Oufella et al., 2014).

L'hypercholestérolémie est considérée comme l'un des principaux déclencheurs de l'athérosclérose. L'augmentation du taux de cholestérol plasmatique favorise la fixation des lipoprotéines à apoB100 par les cellules endothéliales. Dès lors, les LDL pénètrent dans l'espace sous-endothélial (intima) où elles sont oxydées. Par ailleurs, en exprimant des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (« Vascular Cell Adhesion Molecule 1 »), ICAM-1 (« Intercellular Adhesion Molecule 1 ») et les sélectines, les cellules endothéliales favorisent l'adhésion des monocytes circulants qui migrent dans l'espace sous-endothélial (Weber and Noels, 2011). Dans l'intima, les monocytes se transforment en macrophages et s'engorgent massivement de LDL oxydées par l'intermédiaire de récepteurs scavengers (« poubelles ») comme SR-A, SR-B1, CD36 ou CD68. L'apparition de cellules gorgées en lipides, dites cellules spumeuses et la capture croissante de LDL oxydées favorisent ainsi la formation de stries lipidiques à la surface des vaisseaux et constituent la première étape de l'athérosclérose. La mort des cellules spumeuses par apoptose ou par nécrose entraîne ensuite la libération de leur contenu en cholestérol et la formation d'un corps lipidique dans l'intima (Tabas and Bornfeldt, 2016; Ait-Oufella et al., 2014). De plus, les macrophages sécrètent une batterie de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans le recrutement, la migration et la prolifération de cellules musculaires lisses dans l'intima, conduisant à la formation d'une chape fibreuse épaisse autour du corps lipidique (Pryma et al., 2019). La progression temporelle de ces événements engendre un épaissement et/ou une calcification de la plaque d'athérome, soit jusqu'à l'obstruction ou la sténose de l'artère, soit jusqu'à la rupture et la formation d'un thrombus obstructif du vaisseau (Tabas and Bornfeldt, 2016).

## 1.2. Le métabolisme intégré des lipoprotéines

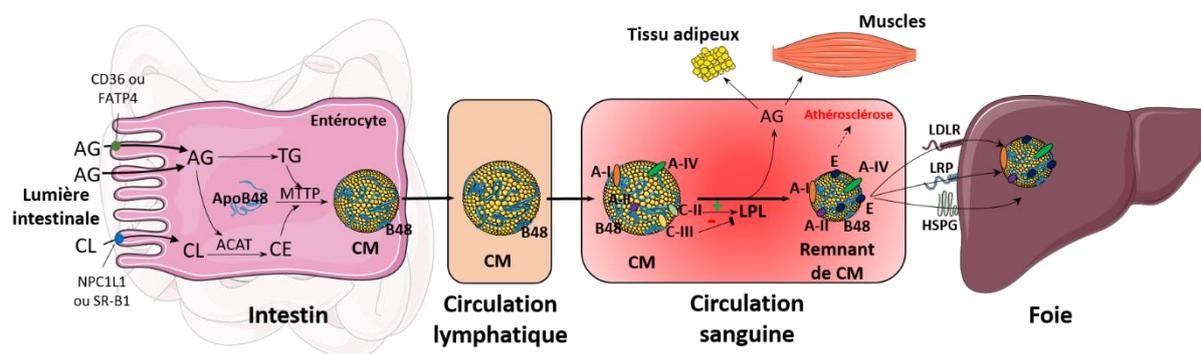
Les acides gras constituent l'élément lipidique de base et majoritaire utilisé comme substrat énergétique, notamment dans les cellules musculaires. Ils peuvent aussi être stockés sous forme de triglycérides dans les adipocytes et sont des constituants essentiels des membranes biologiques lorsqu'ils sont sous forme de phospholipides. Le métabolisme des lipoprotéines est traditionnellement décrit selon les trois voies essentielles que sont : (1) la voie exogène de l'intestin vers le foie, (2) la voie endogène du foie vers les tissus périphériques, et (3) la voie retour ou transport inverse du cholestérol (Feingold and Grunfeld, 2000).

### 1.2.1. La voie exogène

Lors d'un repas, les lipides ingérés sont majoritairement des triglycérides agglomérés en larges agrégats. Lorsqu'ils parviennent dans le duodénum, ces agrégats sont émulsifiés en microgouttelettes par les acides biliaires produits par le foie et sécrétés par le canal cholédoque. La lipase pancréatique va hydrolyser les triglycérides de ces micelles pour libérer deux acides gras et un monoglycéride. Ces composés sont principalement absorbés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes par des transporteurs protéiques tels que CD36 (« cluster of differentiation 36 ») et FATP4 (« fatty acid transport protein 4 »), ou par simple diffusion à travers la membrane apicale des entérocytes. L'absorption du cholestérol d'origine alimentaire se fait essentiellement *via* le transporteur NPC1L1 (« Niemann-Pick C1-like 1 ») et dans une moindre mesure par le récepteur scavenger B1 (SR-B1) (Ko et al., 2020). Dans les entérocytes, les acides gras sont reconstitués en triglycérides et le cholestérol libre est estérifié par l'ACAT (« acyl-CoA cholesterol acyltransferase »). Les triglycérides et le cholestérol estérifié sont ensuite incorporés, grâce à la MTP (« microsomal triglyceride transfer protein »), aux pré-chylomicrons. Ces derniers, composés d'une unique apoB48, s'engorgent progressivement de lipides pour devenir matures. Ils sont alors exocytés au niveau de la membrane basale de l'entérocyte vers le système lymphatique. Les chylomicrons rejoignent ensuite la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche puis acquièrent des apolipoprotéines A (A-I, A-II, A-V) et des apolipoprotéines C (C-I, C-II, C-III) provenant des HDL.

La lipoprotéine lipase est une enzyme sécrétée par les cellules musculaires et les adipocytes et est localisée dans l'endothélium vasculaire sous-jacent le tissu adipeux ou le muscle. Elle est activée et inactivée respectivement par l'apoC-II et l'apoC-III. L'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons par la lipoprotéine lipase engendre la formation d'acides gras libres, récupérés ensuite par les cellules adipeuses et musculaires pour les stocker ou les utiliser comme

substrats énergétiques. En perdant leur contenu en triglycérides, les chylomicrons diminuent de volume et se convertissent en remnants de chylomicrons, de plus petite taille et plus dense, qui perdent leurs apolipoprotéines C mais récupèrent de l'apoE des HDL. Enfin, les remnants de chylomicrons sont internalisés par les hépatocytes grâce à la reconnaissance de l'apoE principalement par le récepteur au LDL (LDLR), le LRP (« LDL receptor related protein ») ou l'HSPG (« heparan sulfate proteoglycans »), une glycoprotéine souvent liée au LRP et constituée de nombreuses chaînes de sulfate d'héparane (**Figure 3**) (Feingold and Grunfeld, 2000; Phillips, 2014).



**Figure 3** – Voie exogène (inspiré de Feingold and Grunfeld, 2000).

L'accumulation excessive des chylomicrons et de leurs remnants dans certains types de dyslipidémies est associée à un risque d'athérosclérose élevé (Carvalho et al., 2002).

### 1.2.2. La voie endogène

Quelques heures après la prise alimentaire, la quantité de chylomicrons circulants devient faible et les besoins en triglycérides de l'organisme sont alors assurés par des lipides synthétisés ou redistribués par le foie. Il s'agit de la voie endogène. La voie endogène permet le transport des lipides synthétisés au niveau hépatique ou issus des remnants de chylomicrons, du foie vers les organes périphériques, principalement le tissu adipeux pour leur stockage, et les muscles pour y être catabolisés afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate).

La synthèse des VLDL s'effectue dans les hépatocytes *via* la MTTP qui assemble principalement des triglycérides à l'apoB100 (Gibbons et al., 2004). Les VLDL sécrétées acquièrent les apoC-II, apoC-III et apoE des HDL. De manière identique aux chylomicrons, la lipoprotéine lipase hydrolyse les triglycérides des VLDL conduisant à la formation d'IDL de plus petites tailles enrichies en apoE. Les triglycérides non hydrolysés des VLDL et IDL

peuvent également être échangés avec des phospholipides et du cholestérol estérifié contenus dans les HDL *via* une protéine de transfert, la CETP (« cholesterylester transfer protein »). L'hydrolyse des triglycérides des IDL par la lipase hépatique réduit à nouveau leur taille et forme les LDL, dépourvues en apoE, et contenant dans leur cœur majoritairement du cholestérol estérifié. Les LDL sont ensuite captées et internalisées principalement par le foie (~70%). L'internalisation se fait grâce à la fixation de l'apoB100 sur le LDLR membranaire, dont l'abondance est régulée par PCSK9 (« proprotein convertase subtilisin kexin type 9 »), un inhibiteur naturel du LDLR empêchant son recyclage intracellulaire après endocytose (Lambert et al., 2012). Outre les LDL, les VLDL et les IDL peuvent aussi être internalisées par les cellules hépatiques *via* l'apoB100 (VLDL, IDL et LDL) par le LDLR ou *via* l'apoE (VLDL et IDL), toujours par le LDLR, le LRP ou l'HSPG (Figure 4) (Feingold and Grunfeld, 2000).

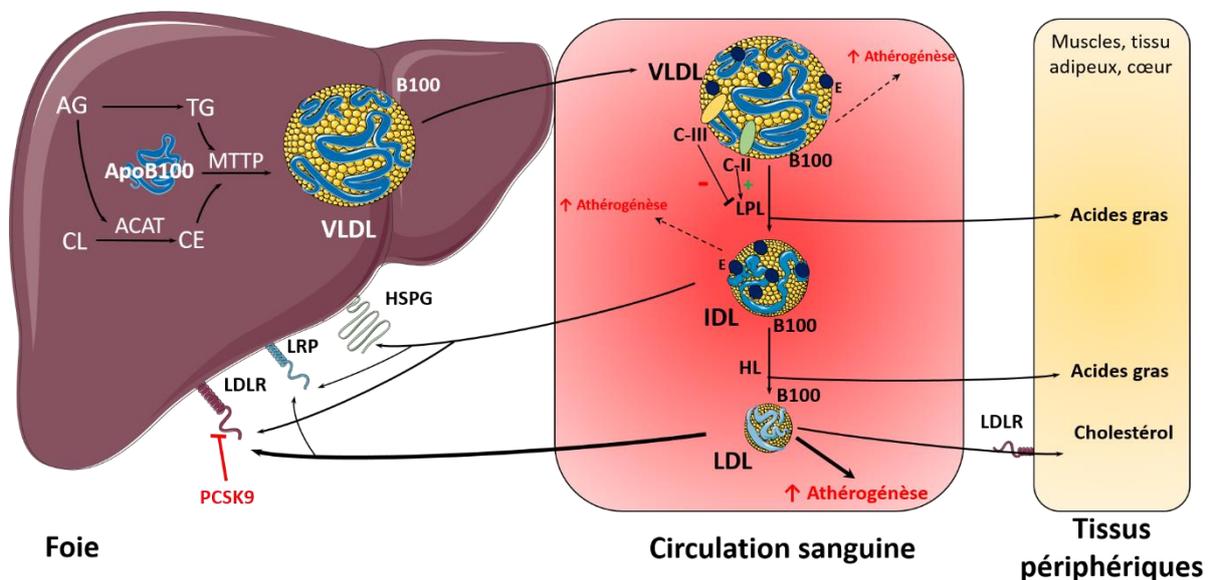


Figure 4 – Voie endogène (inspiré de Feingold and Grunfeld, 2000).

Chez l'homme, les LDL constituent la première forme de transport du cholestérol par les lipoprotéines dans le plasma. De ce fait, la voie endogène est aussi la plus athérogène puisque le LDL cholestérol représente un facteur de risque pour la formation des plaques d'athérome et ainsi un risque majeur de survenue d'accidents cardiovasculaires. L'hypercholestérolémie familiale est un syndrome sévère à transmission autosomique dominant du métabolisme des lipoprotéines, qui se caractérise par une élévation anormale des concentrations de LDL cholestérol (> 200 mg/dL) et un risque accru de maladies cardiovasculaires. L'hypercholestérolémie familiale résulte principalement de la présence de mutations du *LDLR* (Brown and Goldstein, 1986) ou, dans des cas plus rares, de mutations de l'*APOB* (Innerarity

et al., 1987), de l'APOE (Marduel et al., 2013) ou de mutations « gain-de-fonction » (GOF) de PCSK9 (Abifadel et al., 2003; Varret et al., 1999). Toutes ces mutations sont liées directement ou indirectement au fonctionnement du LDLR et à sa capacité d'épuration des LDL. Les mutations de l'apoB100 induisent généralement une réduction de son affinité pour le LDLR réduisant ainsi la clairance des LDL. Les mutants GOF de PCSK9 présentent en général une affinité plus élevée pour le LDLR induisant ainsi une diminution considérable de son expression à la surface des hépatocytes (Lambert et al., 2012).

Par ailleurs, le gène PCSK9 présente également des mutations dites « perte-de-fonction » (LOF). Les individus porteurs de ces mutations présentent des taux de LDL cholestérol bas (< 70 mg/dL) et leur risque de développer des maladies cardiovasculaires est significativement réduit (Cohen et al., 2005). D'autres dyslipidémies comme l'hypobêtalipoprotéïnémie (HBL) et l'abêtalipoprotéïnémie (ABL) se caractérisent respectivement par une forte diminution ou une absence totale d'expression de l'apoB100 ou de la MTTP, empêchant ainsi la formation de chylomicrons et de VLDL. Bien que les taux de cholestérol totaux et de LDL cholestérol associés à ces pathologies soient bas, les patients les plus sévèrement atteints présentent des complications graves comme des neuropathies, des coagulopathies ou une dégénérescence de la rétine (Lee and Hegele, 2014).

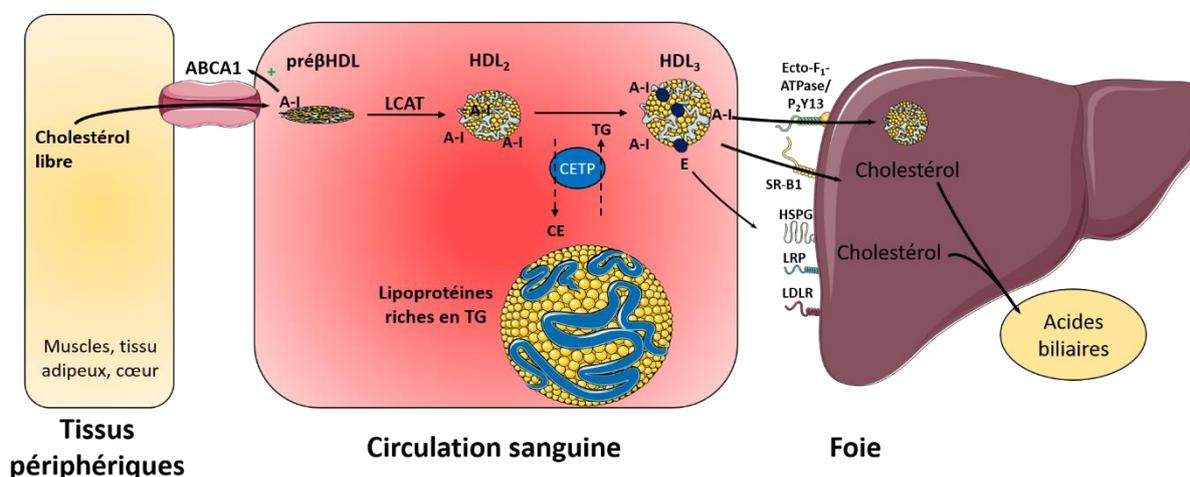
### 1.2.3. Le transport inverse du cholestérol

À l'inverse de la voie endogène, les HDL assurent le retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie. Les HDL natives (pré $\beta$ -HDL) de forme discoïdale sont pauvres en lipides neutres et ne contiennent que quelques phospholipides mais plusieurs molécules d'apoA-I. Ils acquièrent du cholestérol libre et des phospholipides des cellules des tissus périphériques par l'intermédiaire du transporteur ABCA1 (« ATP-binding cassette A1 »). Chez les patients ayant des mutations homozygotes sur ce transporteur, la capture du cholestérol libre et des phospholipides par l'apoA-I est impossible conduisant à son catabolisme rapide au niveau rénal et à des taux de HDL cholestérol très faibles. Une fois pris en charge par les pré $\beta$ -HDL, le cholestérol libre est estérifié avec un acide gras transféré d'un phospholipide par la LCAT (« lécithine-cholestérol-acyltransférase »), une enzyme activée par l'apoA-I. Le cholestérol estérifié, hydrophobe, migre alors vers le cœur des pré $\beta$ -HDL. L'activité LCAT est nécessaire à la formation des HDL sphériques. Une déficience génétique de LCAT chez l'Homme entraîne un effondrement des taux de HDL cholestérol et d'apoA-I et un pourcentage plus important de petites particules de HDL de type pré $\beta$  (Rye and Barter, 2014; Rosenson et al., 2012).

Comme évoqué précédemment, la CETP assure respectivement le transfert du cholestérol estérifié des HDL sphériques vers les lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons, VLDL) en échange de leurs triglycérides. Ces échanges permettent le remodelage des HDL et leur stabilisation. Les patients déficients en CETP ont des taux de HDL cholestérol élevés et des taux de LDL cholestérol bas (Rye and Barter, 2014; Rosenson et al., 2012).

Le cholestérol du cœur des HDL matures est ensuite capté de manière sélective par le récepteur SR-B1 des hépatocytes. Les particules de HDL peuvent aussi être captées et endocytées directement *via* la fixation de l'apoA-I au complexe ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> au niveau du foie (Martinez et al., 2003). Finalement, le foie va éliminer le cholestérol, soit sous forme libre, soit sous forme d'acides biliaires dans la bile. Par ailleurs, la présence d'apoE à la surface des HDL rend leur internalisation possible par d'autres récepteurs (LDLR, LRP, HSPG) impliqués dans l'augmentation de cholestérol intracellulaire (Feingold and Grunfeld, 2000).

Le cholestérol des HDL peut être épuré selon deux voies métaboliques distinctes. Il peut être capté par SR-B1 ou le complexe au niveau du foie ou être transféré aux lipoprotéines à apoB100 par la CETP (Figure 5). Dans ce cas, le cholestérol suit finalement la voie endogène classique jusqu'à son internalisation par le LDLR sous forme de LDL cholestérol, principalement.



**Figure 5** – Transport inverse du cholestérol (inspiré de Feingold and Grunfeld, 2000).

Chez l'Homme la voie retour du cholestérol vers le foie semble être impliquée dans la prévention de l'athérosclérose. Les concentrations en HDL cholestérol sont en effet inversement corrélées au risque cardiovasculaire. En plus de leur rôle antiathérogène *via* l'efflux de cholestérol au niveau des artères, les HDL ont des effets pléiotropes, notamment des propriétés antioxydantes, anti-apoptotiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques ou anti-

protéolytiques qui expliquent leur action protectrice sur les cellules endothéliales ([Martinez et al., 2017](#); [Tran-Dinh et al., 2013](#))

#### **1.2.4. Rôles des apolipoprotéines dans le métabolisme des lipoprotéines**

Les apolipoprotéines sont de natures et de structures très variées et jouent un rôle fondamental dans la régulation et le métabolisme des lipoprotéines. Leurs trois fonctions majeures sont (1) le contrôle de la formation et le maintien de la structure des lipoprotéines. C'est le cas de l'apoB48 (chylomicrons), de l'apoB100 (VLDL, IDL, LDL) et de l'apoA-I (HDL). Les apolipoprotéines comme l'apoE et l'apoB100 sont également des ligands de récepteurs aux lipoprotéines tels que le LDLR, le LRP et l'HSPG (2). L'apoA-I est aussi un ligand du transporteur ABCA1 et du récepteur ecto-F1-ATPase. Enfin, les apolipoprotéines peuvent activer ou inhiber l'activité des enzymes du métabolisme des lipoprotéines comme la lipoprotéine lipase (apoC-II ou apoC-III) ou la LCAT (apoA-I) (3) ([Dominiczak and Caslake, 2011](#)).

Des concentrations anormales en apolipoprotéines sont associées à de nombreux troubles spécifiques du métabolisme lipidique. Outre l'apoA-I et l'apoB100 utilisés traditionnellement comme marqueurs des dyslipidémies, l'apoE est également une protéine incontournable et omniprésente dans le métabolisme lipoprotéique. En effet, elle est présente dans toutes les principales classes de lipoprotéines hormis les LDL. L'apoE assure de multiples fonctions, y compris dans la clairance et la production des lipoprotéines riches en triglycérides. Ceci lui également un rôle important, bien qu'indirect, dans le métabolisme des LDL et par conséquent dans l'apparition de complications cardiovasculaires ([Mahley, 2016](#)).

### **1.3. L'apolipoprotéine E**

En 1973 et 1974, une nouvelle protéine riche en arginine est observée dans les fractions de VLDL et HDL isolées à partir de plasma humain ([Shore and Shore, 1973](#); [Langer et al., 1974](#)). Cette nouvelle apolipoprotéine, l'apoE, diffère des autres par sa composition en acides aminés et par sa mobilité électrophorétique. Son abondance dans les VLDL et les HDL suggère à l'époque qu'elle joue un rôle déterminant dans le métabolisme lipoprotéique ([Utermann, 1975](#)).

#### **1.3.1. Structure et rôle de l'apoE dans le métabolisme des lipoprotéines**

L'apoE est une glycoprotéine circulante de 34,2 kDa composée de 299 acides aminés et codée par le gène *APOE* localisé sur le chromosome 19. L'apoE est divisée en deux domaines

structuraux séparés par une région charnière. Le domaine N-terminal (acides aminés 1-191) formé de quatre hélices- $\alpha$  anti-parallèles, contient la région de reconnaissance du LDLR. Le domaine C-terminal formé d'hélices- $\alpha$  amphipatiques contient la région de liaison aux lipides (Mahley, 2016). L'apoE est une protéine ubiquitaire. Elle est principalement synthétisée dans le foie et le cerveau, et en faible quantité par les macrophages. Elle s'associe aux lipoprotéines riches en triglycérides pour assurer la clairance de leurs remnants, après la cascade de lipolyses enzymatiques, dans la circulation *via* le LDLR, le LRP et l'HSPG (Marais, 2019). La cargaison lipidique délivrée aux hépatocytes par endocytose des lipoprotéines riches en triglycérides est ensuite catabolisée dans les lysosomes alors que la majorité de l'apoE reste dans les endosomes pour son recyclage. Ce pool d'apoE est recyclé vers la membrane plasmique, re-sécrété puis lié à certaines particules de HDL. L'apoE sécrétée par les macrophages contribue ainsi au renouvellement du pool d'apoE des HDL. Par ailleurs, elle joue un rôle anti-athérogène important en favorisant l'efflux de cholestérol des cellules de la paroi artérielle par la voie retour du cholestérol (Phillips, 2014).

Chez l'Homme, la déficience en apoE, caractérisée par une absence totale ou un défaut fonctionnel de l'apoE, favorise l'apparition des maladies coronariennes et cérébro-vasculaires précoces. (Schaefer et al., 1986). L'absence d'apoE engendre un défaut de catabolisme des VLDL, des chylomicrons et de leurs remnants en raison d'une clairance diminuée et d'une lipolyse altérée (Ikewaki et al., 2004). Les souris dont le gène *APOE* a été inactivé par recombinaison homologe (souris *APOE* « knock out »), présentent un profil lipoprotéique caractérisé par l'accumulation de VLDL et d'IDL et une augmentation des LDL. Ces souris constituent un modèle animal de référence pour la recherche *in vivo* des processus athéromateux car elles développent spontanément des plaques d'athérosclérose (Plump et al., 1992).

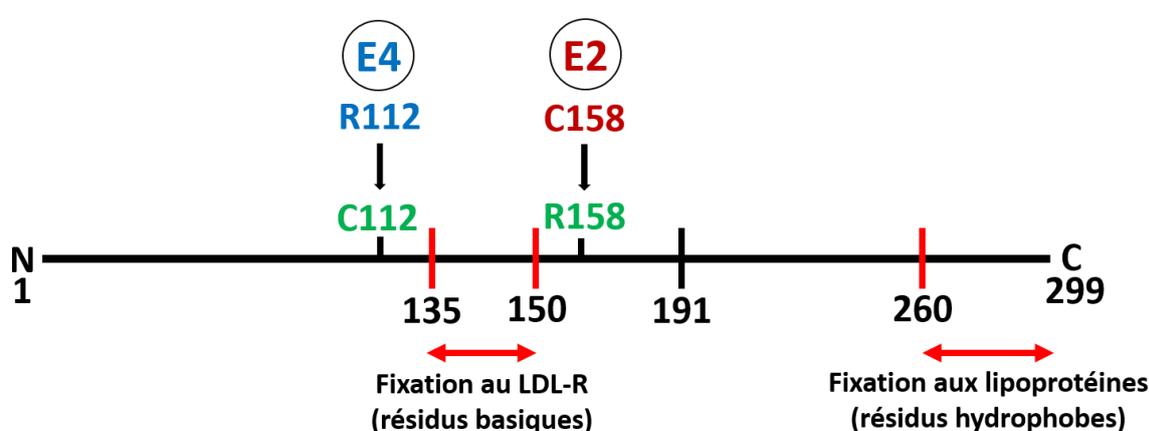
L'apoE joue aussi un rôle intracellulaire dans l'assemblage et la sécrétion des VLDL par les hépatocytes. La surexpression et l'accumulation d'apoE intracellulaire stimule la production de VLDL enrichies en triglycérides et est associée à une hypertriglycémie. En outre, un excès d'apoE sur les particules de VLDL peut altérer leur lipolyse, ce qui élève également les taux plasmatiques en triglycérides (Huang et al., 1998).

### 1.3.2. Le polymorphisme de l'apolipoprotéine E

De nombreux variants génétiques de l'apoE ont été décrits chez l'Homme. Les trois majoritaires entraînent la synthèse des trois isoformes nommées apoE2, apoE3 et apoE4 issues des trois

allèles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ , et se distinguent par une mutation faux-sens de l'*APOE*. La combinaison de ces trois variants amène à trois phénotypes homozygotes (E2/E2, E3/E3 et E4/E4) et trois phénotypes hétérozygotes (E2/E3, E3/E4 et E2/E4).

La base structurelle des trois isoformes survient par des modifications d'acides aminés aux résidus 130 et 176 : l'apoE2 possède des cystéines aux deux sites, l'apoE4 possède des arginines aux deux sites, et l'apoE3 possède une cystéine en position 130 et une arginine en position 176 (**Figure 6**) (Rall et al., 1982). L'apoE3 est considérée comme la forme sauvage car elle est retrouvée dans 65 à 70% de la population générale alors que les apoE4 et apoE2 présentent des occurrences respectives d'environ 15-20% et 5-10% (Mahley, 2016).



**Figure 6** – Représentation linéaire de l'apoE3 et des mutations ponctuelles correspondant à l'apoE2 et à l'apoE4 (inspiré de Phillips, 2014).

### - L'apoE4

La substitution Cys130Arg de l'apoE4 modifie la position et les interactions entre les extrémités N- et C-terminales de la protéine. Ce réarrangement induit l'apparition d'une liaison ionique entre l'arginine en position 61 avec la glutamine en position 255. Cette nouvelle liaison serait à l'origine d'une meilleure capacité de liaison aux lipides ce qui expliquerait la plus forte présence d'apoE4 à la surface des VLDL contrairement à l'apoE3 et à l'apoE2, liées préférentiellement aux HDL (**Figure 7**). En plus d'une meilleure affinité potentielle pour le LDLR par rapport à l'apoE3, l'enrichissement des VLDL en apoE4 pourrait accélérer leur élimination du plasma, notamment par le LDLR hépatique, ce qui expliquerait les plus faibles concentrations plasmatiques en apoE4 par rapport à l'apoE3 et à l'apoE2. Le LDLR serait ainsi sous-exprimé et moins disponible à la surface des hépatocytes pour la capture des LDL,

provoquant ainsi une légère augmentation des concentrations en LDL cholestérol et du risque cardiovasculaire (Bennet et al., 2007; Li et al., 2013).

L'apoE du cerveau est exprimée majoritairement par les astrocytes, mais aussi par les oligodendrocytes, les microglies et les neurones. Elle est indépendante de l'apoE plasmatique puisqu'elle ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique (Linton et al., 1991). L'apoE4 est un facteur de risque majeur pour les troubles neurologiques comme la maladie d'Alzheimer. Le risque de développer cette maladie neurodégénérative est augmenté par quatre pour les hétérozygotes et par 14 pour les homozygotes de l'apoE4, par rapport aux individus E3/E3. L'apoE4 favorise la formation de plaques extracellulaires constituées d'agrégats de peptides  $\beta$ -amyloïdes. Ces plaques entraînent une augmentation du stress oxydatif et de la neuro-inflammation ainsi qu'une diminution de la communication synaptique. Dès lors, l'activité et l'homéostasie neuronale sont perturbées de façon chronique provoquant la dégénérescence progressive et la mort des neurones (Mahley, 2016; Yamazaki et al., 2019).

#### - L'apoE2

La mutation Arg176Cys de l'apoE est délétère par sa proximité avec la région qui se lie au LDLR. La substitution d'une arginine (chargée +) par une cystéine (non chargée), empêche la liaison ionique normalement présente avec l'aspartate (chargé -) en position 154 de l'apoE. Par conséquent, une nouvelle liaison ionique se crée entre l'aspartate en position 154 et l'arginine en position 150, modifiant ainsi la structure tertiaire de l'apoE. Ce changement de conformation spatiale de l'apoE entraîne une diminution drastique de son affinité pour le LDLR (< 2% par rapport à l'apoE3) ainsi qu'une diminution plus modérée pour le LRP (~50% par rapport à l'apoE3) (Figure 7) (Dong et al., 1996; Weisgraber et al., 1982). Les individus porteurs de l'apoE2 présentent généralement des concentrations en apoE et en triglycérides plasmatiques élevées dues à un défaut de catabolisme des remnants de chylomicrons et des VLDL. Leurs taux en LDL cholestérol sont aussi relativement bas et s'expliqueraient en partie par un défaut de conversion des lipoprotéines riches en triglycérides en LDL (Marais, 2019). En raison de la faible affinité de l'apoE2 pour le LDLR, ce dernier serait plus disponible pour la clairance des LDL et contribuerait également à la diminution des taux de LDL cholestérol (Moriarty et al., 2017). Dans environ 10% des cas, les individus homozygotes E2/E2 développent une hyperlipoprotéïnémie de type III (dysbétalipoprotéïnémie) après 30 ans qui se caractérise par une accumulation pathologique d'IDL et de remnants de chylomicrons associée à un risque cardiovasculaire élevé (Marais, 2015; Smelt and de Beer, 2004).

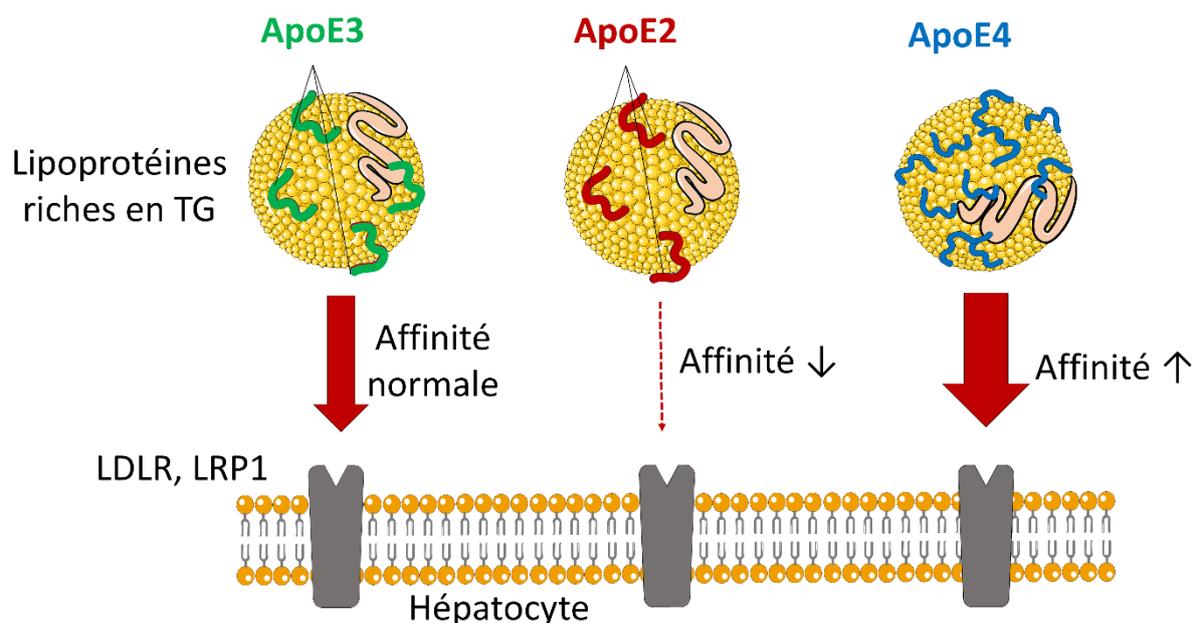


Figure 7 – Affinité des isoformes de l'apoE sur le LDLR et sur le LRP.

### 1.3.3. Physiopathologie de la dysbêtalipoprotéïnémie

La dysbêtalipoprotéïnémie (ou hyperlipoprotéïnémie de type III) est une dyslipoprotéïnémie hautement athérogène caractérisée par l'accumulation anormale de remnants de chylomicrons et de VLDL enrichies en triglycérides et cholestérol. Elle apparaît généralement chez l'homme adulte et en période de post-ménopause chez la femme, lorsque le métabolisme des lipoprotéines devient moins efficace (surproduction et défaut de clairance des lipoprotéines) (Marais, 2019). Elle se manifeste d'abord par une anomalie dans l'élimination des chylomicrons et VLDL par le foie et une augmentation de leur temps de résidence dans le plasma. Pendant cette période prolongée dans la circulation, les lipoprotéines riches en triglycérides s'enrichissent en cholestérol estérifié provenant des HDL par l'intermédiaire de la CETP. Par conséquent, le ratio cholestérol/triglycérides et apoC-III/apoB100 se trouve anormalement élevé ce qui diminuerait considérablement l'efficacité des lipases (lipoprotéine lipase et lipase hépatique) et la conversion des VLDL en IDL et des IDL en LDL (Sniderman et al., 2018; de Graaf et al., 2008). Chez les homozygotes E2/E2, le développement de la dysbêtalipoprotéïnémie est lié à la présence d'un facteur de risque supplémentaire associé, soit à une augmentation de la production de VLDL liée à l'obésité, au syndrome métabolique, à la résistance à l'insuline et à la grossesse, soit à une diminution de la clairance des remnants liée à l'âge, à la ménopause et également à la résistance à l'insuline (de Beer et al., 2002; Chuang et al., 2009; Koopal et al., 2015, 2017; Mahley et al., 1999).

D'autres mutations naturelles de l'apoE sont également associées à une transmission autosomique dominante de la dysbétalipoprotéïnémie souvent plus sévère, telles que les mutations Arg160Cys, Arg163Cys, Lys164Gln et Leu167del (Marais, 2019). De manière similaire à l'apoE2, la substitution d'un acide aminé chargé positivement (arginine ou lysine) par un acide aminé neutre (cystéine ou glutamine) des mutations Arg160Cys, Arg163Cys et Lys164Gln, réduit la charge positive dans la région de reconnaissance au LDLR et diminue l'affinité de l'apoE pour ce dernier de 60% à 80% par rapport à l'isoforme apoE3 commune (Ji et al., 1994; Zaiou et al., 2000). Comme l'apoE porteuse des mutations Arg160Cys, Arg163Cys ou K146Q a une meilleure affinité de liaison avec le LDLR que l'apoE2, le caractère dominant de la dysbétalipoprotéïnémie à transmission autosomique associé à ces trois variants, ne s'explique pas par un défaut de fixation au LDLR. En effet, les mutations Arg160Cys et Arg163Cys induisent un défaut de fixation à l'HSPG encore plus marqué que l'apoE2. Comme l'HSPG est généralement associé au LRP, la voie d'internalisation *via* ce récepteur est également défectueuse (Ji et al., 1994). Compte tenu de la proximité de la mutation Lys164Gln avec les mutations Arg160Cys et Arg163Cys, l'hypothèse d'un défaut de reconnaissance de l'apoE à l'HSPG induit par la mutation Arg160Cys est privilégiée (Mahley, 1996).

#### 1.3.4. Le lien entre l'apoE et la lipoprotéine (a)

Outre les lipoprotéines citées précédemment, les concentrations plasmatiques de la Lp(a), associées à l'apparition d'athérome prématuré, sont aussi en partie régulées par l'apoE et son polymorphisme. L'apoE est présente sur une minorité des particules de Lp(a) et son rôle en tant que constituant de cette lipoprotéine n'a pas encore été établi (von Zychlinski et al., 2014; Bach-Ngohou et al., 2001; Bard et al., 1992). De plus, les sujets porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  présentent moins de Lp(a) que les sujets porteurs des allèles  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$  (Kritharides et al., 2017). Certaines études montrent également que l'allèle  $\epsilon 4$  est associé à des taux de Lp(a) plus élevés que l'allèle  $\epsilon 3$  (de Knijff et al., 1991; Moriarty et al., 2017). Les mécanismes à l'origine de ces observations ne sont pas élucidés et l'influence du LDLR est suggérée mais reste très controversée.

## 2. L'exception métabolique de la lipoprotéine (a)

Depuis la découverte du LDLR en 1986, la recherche dans le domaine du métabolisme des lipoprotéines a permis de réaliser des progrès considérables dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose. Pourtant, au-delà des lipoprotéines communes, la Lp(a), dont les concentrations plasmatiques sont associées à la survenue de maladies cardiovasculaires, reste une énigme pour les lipidologues comme pour les cliniciens.

### 2.1. Biologie de la Lp(a)

#### 2.1.1. Découverte

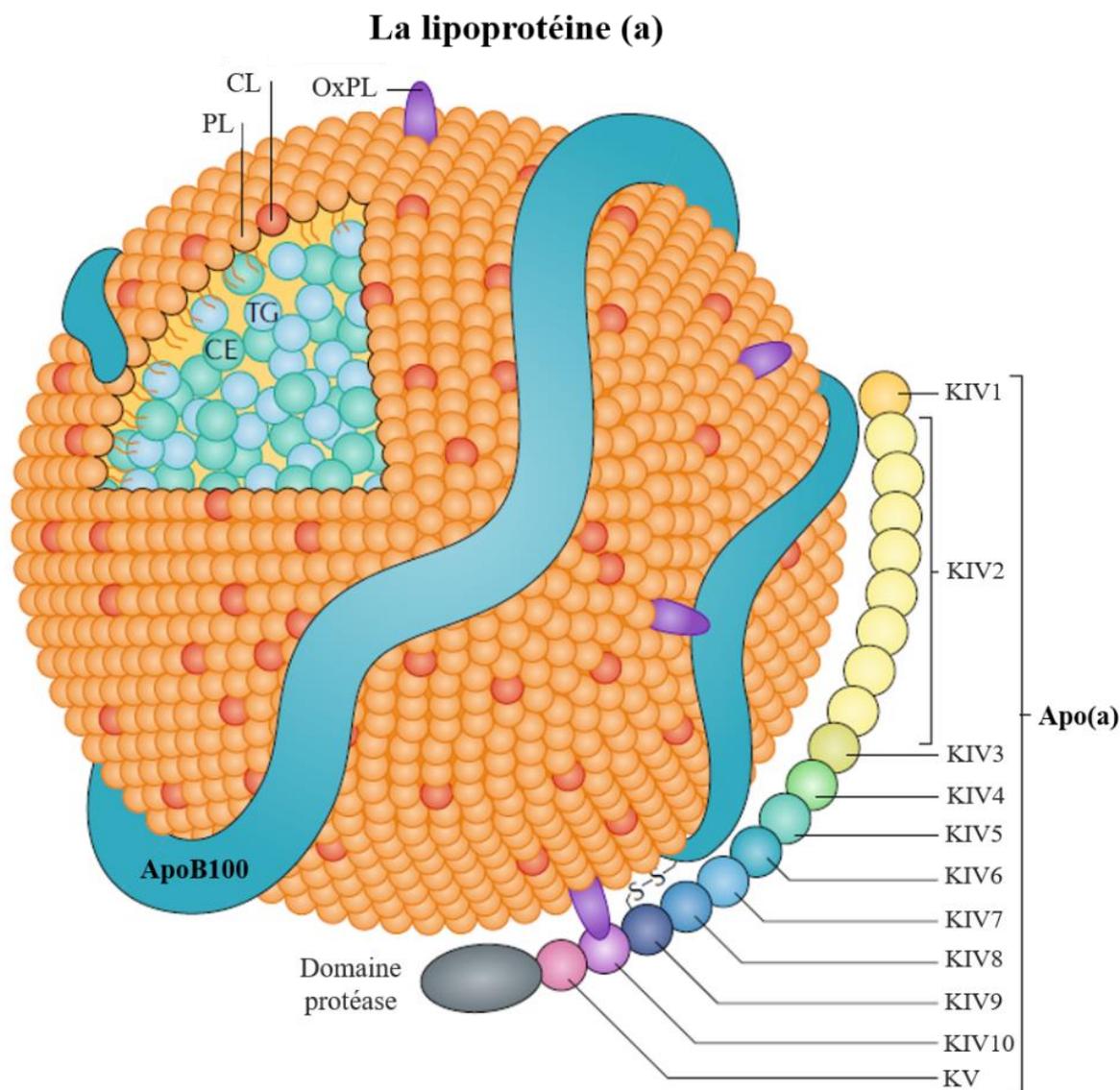
En 1963, le généticien Kåre Berg cherchait à définir les différences des lipoprotéines entre les sérums humains. A l'aide de la technique immunologique d'Ouchterlony ([Ouchterlony, 1948](#)) appliquée sur ces sérums, il découvre un nouvel antigène associé aux LDL de certains patients et transmis de manière autosomique dominante. Il propose de l'appeler Lp(a) avec « Lp » en référence à la structure lipoprotéique de l'antigène, et « (a) » - prononcé « petit a » - respectant ainsi la terminologie de l'époque pour nommer les antigènes chez l'homme ([Berg, 1963](#); [Berg and Mohr, 1963](#)). Le terme « Lp(a) » faisait donc référence au nouvel antigène découvert. Aujourd'hui, ce terme est considéré comme le diminutif de « lipoprotéine (a) ». Cette terminologie a par la suite entraîné beaucoup de confusion dans la littérature et parmi les cliniciens en raison de la lettre « A » majuscule commune aux apolipoprotéines A des HDL et l'antigène (a) de la Lp(a) ([Witztum and Ginsberg, 2016](#)).

Les premiers travaux réalisés à la suite de cette découverte ont conclu que les sujets testés étaient soit Lp(a) positif soit Lp(a) négatif et, dès 1974, Berg et ses collègues ont montré que la proportion de sujets au phénotype Lp(a) positif était significativement plus élevée chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires que chez les individus sains ([Berg et al., 1974](#)). Avec l'amélioration des techniques de mesure de la Lp(a), il a été confirmé que la Lp(a) représentait un facteur de risque héréditaire très répandu pour les maladies cardiovasculaires ([Djurovic and Berg, 1997](#)).

#### 2.1.2. Structure

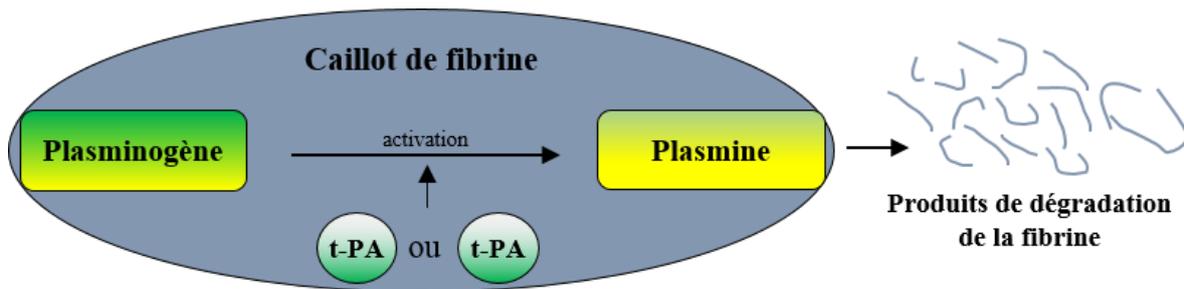
([Barre, 2003](#); [Fless et al., 1984](#)). Sa particularité réside en la présence d'une seconde protéine hautement glycosylée, l'apolipoprotéine (a) [apo(a)] à l'origine de l'antigène (a), et codée par le gène *LPA* situé sur le chromosome 6 (**Figure 8**). Outre l'apoB100 et l'apo(a), la Lp(a) peut

contenir des apolipoprotéines minoritaires comme l'apoE, l'apoA-I ou encore les apolipoprotéines C. PCSK9 (Tavori et al., 2016a) et des protéines de l'inflammation comme celles du complément (C3, C4-A, C5), l'alpha-2 macroglobuline et PON1 (« paraoxonase/arylesterase 1 ») pourraient aussi être liées à la Lp(a) (von Zychlinski et al., 2011).



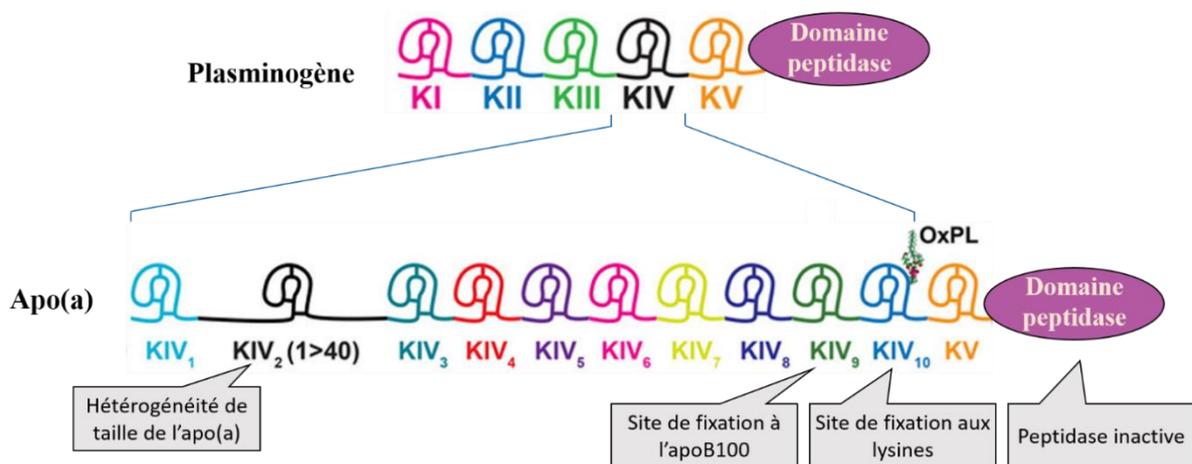
**Figure 8** – Représentation schématique de la lipoprotéine (a) (adaptée de Boffa and Koschinsky, 2019).

Le gène *LPA* possède une forte homologie de séquence avec le gène *PLG* localisé en amont sur le même chromosome et codant pour le plasminogène (McLean et al., 1987). Le plasminogène est le précurseur de la plasmine qui est une enzyme indispensable au système fibrinolytique (Figure 9).



**Figure 9** – Voie d'activation du plasminogène en plasmine par le t-PA ou l'u-PA. t-PA : « tissue-plasminogen activator » ; u-PA : « urokinase-type plasminogen activator ».

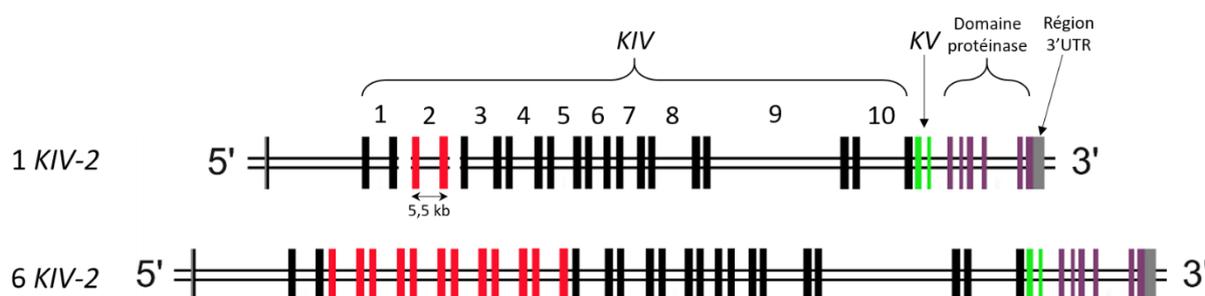
Le plasminogène se compose d'une queue N-terminale suivie de cinq domaines, nommés kringles de I à V (KI à KV), et d'un domaine peptidase actif. L'apo(a) contient uniquement les les KIV et KV ainsi que le domaine peptidase, mais celui-ci est inactif (Kronenberg and Utermann, 2013; McLean et al., 1987). Les kringles sont des structures à triples boucles maintenues par trois liaisons disulfures (Figure 10). Dans le cas du plasminogène, les kringles assurent la liaison avec les résidus lysine de la fibrine. Ensuite, le plasminogène est activé en plasmine par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) ou par l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA). Ainsi, la plasmine peut dégrader la fibrine en catalysant l'hydrolyse de ses liaisons peptidiques situées préférentiellement après un résidu lysine ou arginine (Figure 9). Les kringles de l'apo(a) diffèrent de leurs homologues du plasminogène par quelques modifications d'acides aminés et surtout par leur structure hautement glycosylée (Kratzin et al., 1987; Sangrar et al., 1994).



**Figure 10** - Homologie structurale du plasminogène et de l'apo(a) (inspiré de Tsimikas, 2017). OxPL : phospholipides oxydés.

Il existe dix types de KIV de l'apo(a) chez l'Homme, constitués chacun de 114 acides aminés à l'exception du KIV<sub>1</sub> et du KIV<sub>6</sub> qui sont composés respectivement de 111 et 106 acides aminés (Boffa and Koschinsky, 2019 ; Uniprot : <https://www.uniprot.org/>).

Comme tous les kringles, le KIV<sub>2</sub> est codé par deux exons consécutifs séparés par un intron d'environ 4 kilo-bases. Cependant, contrairement aux autres types de KIV présents en une seule copie, le KIV-2 peut être répété de 1 à plus de 40 exemplaires et englobe jusqu'à 70% de la séquence codante du gène de la LPA (**Figure 11**) (Kronenberg, 2016; McLean et al., 1987; Eaton et al., 1987).



**Figure 11** – Structure du gène LPA avec une ou six répétitions KIV-2 (extrait de *Noureen et al., 2015*). Tous les domaines kringles possèdent deux exons séparés d'un intron, alors que le domaine protéinase comprend 6 exons (violet). Le domaine KIV-2 (rouge) à l'origine du polymorphisme de taille de l'apo(a), mesure environ 5,5 kb et est composé d'un premier exon (160 pb), d'un long intron (4 kb), d'un second exon (182 pb) et d'un intron court (1,2 kb).

Cette variation donne lieu à un important polymorphisme de taille des isoformes de l'apo(a) dans la population, dont le poids moléculaire peut ainsi varier de 300 à 800 kDa. Ce polymorphisme de taille est déterminant car la taille de l'apo(a) est inversement corrélée aux concentrations plasmatiques en Lp(a) (Gavish et al., 1989; Utermann et al., 1987). Ainsi, les individus porteurs de formes courtes d'apo(a) (< 14 KIV-2 soit < 23 KIV) présentent en moyenne 40 mg/dL (~100 nmol/L) de Lp(a) en plus que les individus présentant des formes longues ( $\geq 23$  KIV) (Kronenberg, 2019). De plus il existe trois sous-types de KIV-2 au niveau de la séquence nucléotidique du gène LPA. Ces trois sous-types nommés KIV-2A, KIV-2B, KIV-2C diffèrent par la présence de mutations silencieuses, respectivement aux positions 14, 41 et 86 du premier exon (Parson et al., 2004; McLean et al., 1987) et dont les occurrences varient selon les populations (Noureen et al., 2015).

À l'exception du KIV<sub>1</sub> et du KIV<sub>2</sub>, tous les kringles possèdent un site de reconnaissance aux lysines. Ceux des KIV<sub>5</sub> à KIV<sub>8</sub> sont considérés comme faibles et participent aux interactions

non covalentes avec l'apoB100 qui précèdent la formation de la liaison disulfure (Ernst et al., 1995; Gabel et al., 1996).

La seule cystéine non appariée de la séquence peptidique de l'apo(a) se situe en position 67 du KIV<sub>9</sub> et permet une liaison covalente avec la particule lipoprotéique par l'intermédiaire d'un pont disulfure avec les cystéines en position 3734 ou 4326 de l'apoB100 (**Figure 9**) (Koschinsky et al., 1993; Guevara et al., 1993a, 1993b; McCormick et al., 1995).

Le KIV<sub>10</sub> possède un site de reconnaissance aux lysines défini par sept acides aminés (R35, D55, D57, W62, F64, R71, W72), et considéré comme fort qui pourrait favoriser l'accrochage de phospholipides oxydés sur la séquence aminée du KIV<sub>10</sub>, en particulier au niveau des résidus histidines aux positions 32 et 34 (Leibundgut et al., 2013; Boffa and Koschinsky, 2019). Ce site contribuerait également à inhiber la formation de plasmine en se fixant à la fibrine ou aux récepteurs cellulaires de surface au détriment du plasminogène (Harpel et al., 1989; Romagnuolo et al., 2018).

À la manière du KIV<sub>10</sub>, le KV et le domaine protéase semblent empêcher l'activation du plasminogène en plasmine de façon plus modérée (Romagnuolo et al., 2018). De plus, l'étude réalisée par Edelstein et ses collègues a montré que le KV était l'unique région de l'apo(a) capable de capter les phospholipides oxydés (Edelstein et al., 2003), en contradiction des résultats obtenus par Leibundgut (Leibundgut et al., 2013).

### 2.1.3. Métabolisme

Malgré les investigations réalisées sur la Lp(a) depuis sa découverte, les mécanismes par lesquels elle est produite et catabolisée restent très mal connus et font toujours l'objet de controverses. De plus, le gène *LPA* n'est exprimé que chez l'Homme et quelques primates. L'apo(a) des singes ne possède pas exactement les mêmes propriétés que celle de l'Homme ce qui complique considérablement les recherches *in vivo*. Les modèles de souris transgéniques sont fréquemment utilisés pour la recherche sur la Lp(a) mais l'interprétation et la relevance des résultats sont limitées en raison des différences métaboliques considérables qui existent entre l'Homme et la souris.

### - Biosynthèse de l'apo(a)

L'apo(a) est produite quasi exclusivement par le foie et suit les étapes classiques de biosynthèse des glycoprotéines (Kraft et al., 1989; McLean et al., 1987). Après sa traduction et pendant une durée de 30 à 60 minutes, correspondant au temps de résidence dans le réticulum endoplasmique puis dans l'appareil de Golgi, l'apo(a) subit de nombreuses modifications post-traductionnelles avant d'être sécrétée. Dans une étude cinétique réalisée par radio-marquage sur des hépatocytes primaires de babouins, White et ses collègues ont estimé le temps de parcours de l'apo(a), de sa traduction à sa sécrétion, à environ 5 heures. Dans un premier temps, l'apo(a) est synthétisée sous forme de protéine native avec un faible poids moléculaire (White et al., 1994). Du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi, de nombreuses *N*- et *O*-glycosylations ont lieu sur l'ensemble de la séquence polypeptidique de l'apo(a), entraînant par conséquent une augmentation considérable de son poids moléculaire (Fless et al., 1986). La structure de l'apo(a) nécessite la formation d'un grand nombre de liaisons disulfures intramoléculaires et seules les protéines correctement repliées peuvent sortir du réticulum endoplasmique (Gething and Sambrook, 1992; White et al., 1993). Par conséquent, le temps nécessaire au repliement de l'apo(a) peut retarder son déplacement vers l'appareil de Golgi. De plus, les données de White ont montré que plus de 50% de l'apo(a) intracellulaire était sous sa forme mature, suggérant la présence d'une étape supplémentaire limitant la vitesse de sécrétion d'apo(a) mature au niveau de la face trans de l'appareil de Golgi (White et al., 1994). Enfin, la sécrétion de l'apo(a) se fait soit sous forme libre, soit liée à une lipoprotéine de type LDL (Kostner et al., 2013).

### - Assemblage de la Lp(a)

Contrairement aux LDL, la biosynthèse de la Lp(a) ne résulte pas de la modification lipolytique d'une lipoprotéine précurseur de type VLDL qui contiendrait l'apo(a) en plus de l'apoB100 (Krempler et al., 1979). La Lp(a) se forme probablement indépendamment des autres lipoprotéines et plusieurs hypothèses ont été émises quant à son lieu d'assemblage.

Trois études *in vitro* réalisées sur des hépatomes humains transfectés (HepG2) (Koschinsky et al., 1993; Lobentanz et al., 1998) et sur des hépatocytes primaires de babouins (White and Lanford, 1994) ont montré que la Lp(a) pourrait se former à la surface des hépatocytes ou dans la circulation grâce à la fixation de l'apo(a) nouvellement sécrétée sur une lipoprotéine à apoB100, le plus souvent une LDL. Une autre étude réalisée sur un modèle de souris transgéniques exprimant l'apo(a) humaine a également montré que la formation de la Lp(a)

aurait lieu dans la circulation et nécessiterait la présence de LDL d'origine humaine. Cependant, une étude *in vitro* a montré la présence de complexes apo(a)-apoB100 intracellulaires dans des cellules hépatiques humaines, suggérant que la présence de LDL ne serait pas indispensable à la production de particules de Lp(a) (Bonnen et al., 1997).

D'autres résultats obtenus à partir d'études cinétiques *in vivo* basées sur l'injection de traceurs enrichis en isotopes stables orientent vers des pistes opposées sur l'assemblage de la Lp(a) chez l'Homme. Les résultats obtenus par Su en 1998 et Frischmann en 2012 montrent des courbes d'enrichissement et des vitesses de production similaires entre l'apo(a) et l'apoB100 de la Lp(a) en faveur d'un assemblage intracellulaire ou dans un compartiment extracellulaire indépendant et séparé des lipoprotéines circulantes (Su et al., 1998; Frischmann et al., 2012). Dans leur étude, Demant et ses collègues affirment au contraire que l'apoB100 de la Lp(a) circulante provient à la fois d'une néosynthèse et des IDL ou LDL préformées, suggérant un assemblage extracellulaire de la Lp(a) (Demant et al., 2001). Enfin, d'autres équipes évoquent la possibilité d'un pool de Lp(a) formé dans le plasma à partir d'apo(a) recyclée (Sharma et al., 2017; Diffenderfer et al., 2016; Jenner et al., 2005).

### - Clairance

La clairance de la Lp(a) circulante se produit principalement dans le foie et le rein mais les mécanismes exacts n'ont pas encore été élucidés (Cain et al., 2005). Plusieurs récepteurs ont été identifiés et le LDLR (Hofmann et al., 1990; Raal et al., 2016; Romagnuolo et al., 2015), les récepteurs scavengers (Yang et al., 2013) et le récepteur au plasminogène PlgRKT (Sharma et al., 2017) semblent être les voies d'élimination les plus probables. Certains seraient impliqués dans l'absorption de la particule entière et d'autres dans l'assimilation de composants spécifiques comme les phospholipides oxydés.

**Le récepteur au LDL** – La similitude de la Lp(a) avec les LDL fait du LDLR un candidat évident, mais les données contradictoires sur son implication rendent difficile la conclusion d'un rôle précis pour ce récepteur dans l'endocytose de la Lp(a). Les premières études *in vitro* montrent en effet un rôle du LDLR dans la clairance de la Lp(a) par des fibroblastes humains et par des cellules HepG2 (Havekes et al., 1981; Tam et al., 1996). Ces observations ont été confirmées par les travaux de Romagnuolo étudiant le rôle de PCSK9 dans le catabolisme de la Lp(a) (Romagnuolo et al., 2015, 2017). En outre, les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote due à la mutation d'un allèle du gène *LDLR* présentent des concentrations plasmatiques de Lp(a) plus élevées que les sujets sains (Alonso et al., 2014). Les

sujets homozygotes porteurs de deux allèles non fonctionnels du gène *LDLR* présentent quant à eux deux fois plus de Lp(a) que les sujets hétérozygotes, renforçant davantage l'hypothèse d'un rôle du LDLR dans le catabolisme de la Lp(a) (Kraft et al., 2000).

Malgré toutes ces observations, de nombreuses études réfutent cette hypothèse en décrivant un effet modéré voire inexistant du LDLR sur les niveaux plasmatiques de Lp(a). Une étude réalisée sur des souris *LDLR* KO montre une clairance de Lp(a) similaire à celle observée chez des souris « wild type » (Cain et al., 2005). Notre groupe a également montré par une étude cinétique chez le singe que la réduction des taux de Lp(a) engendrée par la neutralisation de PCSK9 s'expliquait par une diminution de la production d'apo(a), excluant un rôle du LDLR dans ces conditions (Croyal et al., 2018). Il semble par ailleurs que les niveaux plus élevés de Lp(a) chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale avec une mutation du gène *LDLR*, proviennent d'une augmentation de sa production médiée par PCSK9 plutôt que d'un défaut de son catabolisme *via* le LDLR (Knight, 1994; Rader et al., 1995; Villard et al., 2016). Une méta-analyse réalisée sur 5 256 patients a récemment démontré que les statines, qui inhibent la production de cholestérol et augmentent l'expression du LDLR à la surface des hépatocytes, contribuent même à une augmentation légère mais significative des concentrations plasmatiques de Lp(a) (Tsimikas et al., 2019). Cependant, il a été proposé que lorsque le LDLR est très fortement exprimé au niveau hépatique, notamment grâce à la combinaison de statines et d'inhibiteurs de PCSK9, les taux de LDL deviennent très bas ce qui permettrait à la Lp(a) de se fixer plus facilement au LDLR malgré une faible affinité pour ce dernier (Watts et al., 2018).

**Le récepteur au plasminogène** – Le récepteur au plasminogène, PlgRKT est ubiquitaire et plutôt exprimé à la surface des leucocytes. PlgRKT semble également être une voie privilégiée pour la capture de la Lp(a) circulante due à l'analogie structurale de l'apo(a) et du plasminogène. Le groupe de McCormick a en effet mis en évidence que PlgRKT est responsable de la majorité du captage de la Lp(a) *in vitro* probablement *via* la reconnaissance des sites de fixation aux lysines de l'apo(a). Après son internalisation, environ une apo(a) sur trois serait dissociée du récepteur PlgRKT puis dirigée vers l'appareil de Golgi afin d'être sécrétée à nouveau librement *via* les endosomes alors que le reste de la lipoprotéine serait envoyé vers le lysosome afin d'être dégradé. En raison d'une internalisation résiduelle de Lp(a) après blocage de PlgRKT, ces chercheurs suggèrent que d'autres récepteurs ou co-récepteurs au plasminogène comme l'Annexine 2 participeraient à l'internalisation de la Lp(a) (Sharma et al., 2017).

**SR-B1** – SR-B1 est un récepteur majoritairement hépatique dont le rôle principal est la capture des esters de cholestérol des HDL (Acton et al., 1996). Comme le complexe ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>, SR-B1 aurait également la capacité d'internaliser entièrement les lipoprotéines telles que les HDL mais aussi les VLDL et les LDL (Wang et al., 1998). Les souris transgéniques surexprimant SR-B1 dans le foie présentent une forte internalisation de la Lp(a), alors que les souris SR-B1 KO présentent une absorption réduite (Yang et al., 2013). De plus, les patients exprimant des variants non fonctionnels de SR-B1 présentent en moyenne des concentrations de Lp(a) plus élevées que des individus sains (Yang et al., 2016). Outre l'absorption de la particule entière, SR-B1 pourrait aussi capter spécifiquement les phospholipides oxydés de la Lp(a) (Sharma et al., 2015).

**Le rein** – Les études observationnelles faites chez des patients atteints de maladies rénales chroniques confirmeraient le rôle du rein dans le catabolisme de la Lp(a). Cette hypothèse est soutenue par la présence de fragments d'apo(a) dans l'urine (Kostner et al., 1996; Mooser et al., 1996) et par des différences de concentrations de Lp(a) entre les veines et les artères rénales, avec des concentrations plus faibles dans les veines (Kronenberg et al., 1997). De plus, il existe une association inverse entre le taux de filtration glomérulaire et les concentrations de Lp(a) plasmatique qui commencent à augmenter dès les premiers stades de l'insuffisance rénale (Kronenberg et al., 2000; Sechi et al., 1998). Cependant cette augmentation n'a été observée que chez les patients avec de grandes isoformes d'apo(a) (Kronenberg et al., 2000). La protéine LRP2 (« LDLR-related protein 2 »), aussi connue sous le nom de mégaline, est un récepteur multi-ligands qui jouerait un rôle dans la réabsorption de divers composés dont des peptides. LRP2 est fortement exprimé dans le rein et pourrait capter la Lp(a) par l'intermédiaire de l'apoB100 (Niemeier et al., 1999).

En plus des récepteurs cités précédemment, de nombreux autres récepteurs comme CD36, LRP1, TLR2 ou le récepteur aux VLDL ont montré une influence dans le catabolisme de la Lp(a) (Tableau 2). Malgré les efforts des spécialistes pour mieux comprendre le catabolisme de la Lp(a), aucune voie métabolique ni récepteur n'ont clairement été identifiés à ce jour.

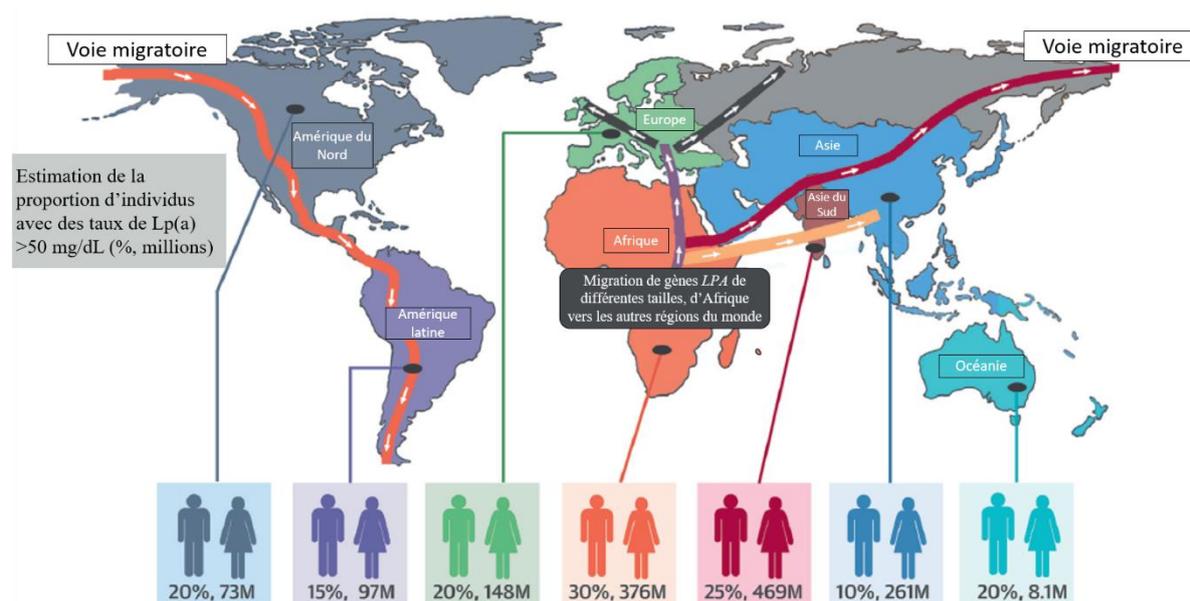
**Tableau 2** – Potentiels récepteurs de la Lp(a).

Récepteurs	Gène	Lieux d'expression	Ligand
Annexine A2	<i>ANXA2</i>	Moelle osseuse, cellules immunitaires, poumons, foie, vésiculaire biliaire, tractus gastro-intestinal, reins, vessie, tissu adipeux, peau, système reproducteur ♀ et ♂	Apo(a)
CD36	<i>CD36</i>	Cellules immunitaires, muscles, tissu adipeux	Phospholipides oxydés
LDLR	<i>LDLR</i>	Système reproducteur ♂, système endocrinien, poumons, foie, vésicule biliaire, poumons, tractus gastro-intestinal, reins, vessie	ApoB100, apoE, apo(a)
LRP1	<i>LRP1</i>	Cerveau, poumons, foie, vésiculaire biliaire, système reproducteur ♀ et ♂, tissu adipeux	ApoE, alpha-2 macroglobuline
Mégaline	<i>LRP2</i>	Reins, système endocrinien	ApoB100
PlgRKT	<i>PLGRKT</i>	Moelle osseuse, cellules immunitaires, poumons, tractus gastro-intestinal, système reproducteur ♀ et ♂	Apo(a)
SR-B1	<i>SCARB1</i>	Système reproducteur ♀ et ♂, système endocrinien, poumons, foie	Phospholipides oxydés
TLR2	<i>TLR2</i>	Moelle osseuse, cellules immunitaires, poumons, tissu adipeux	Phospholipides oxydés
VLDLR	<i>VLDLR</i>	Cerveau, système endocrinien, moelle osseuse, cellules immunitaires, muscles, poumons, tractus gastro-intestinal, foie, reins, Système reproducteur ♀ et ♂,	ApoE, apo(a)

TLR2 : « Toll Like receptor 2 », VLDLR : récepteur au VLDL (« VLDL receptor »).

#### 2.1.4. Ethnicité et Lp(a)

La variabilité des niveaux plasmatiques de Lp(a) entre les différents groupes de populations est marquée. Une telle variation de Lp(a) existe non seulement parmi les individus de même origine, mais également entre différentes populations humaines (Kraft et al., 1996; Gaw et al., 1994; Sandholzer et al., 1991) et chez les primates (Doucet et al., 1994; Williams-Blangero and Rainwater, 1991). Les concentrations moyennes les plus élevées de Lp(a) chez l'Homme sont retrouvées dans les populations africaines et sont suivies par ordre décroissant par celles des populations d'Asie du Sud, des caucasiens, des hispaniques et des populations d'Asie de l'Est (Cobbaert and Kesteloot, 1992; Sandholzer et al., 1991). Cette variation interethnique s'expliquerait par la migration du gène *LPA* hors d'Afrique vers le reste du monde. En effet, en raison des différents schémas de migration des personnes ayant des isoformes de tailles différentes, ainsi que du remodelage ultérieur du gène *LPA*, la prévalence mondiale des taux plasmatiques de Lp(a) est variable (Figure 12). Ces explications demeurent, cependant, très spéculatives.



**Figure 12** – Epidémiologie de la Lp(a) dans le monde (traduit de *Tsimikas et al., 2018*).

Comme la taille de l'apo(a) est inversement corrélée aux concentrations plasmatiques de Lp(a), la différence de fréquences des allèles du *KIV-2*, explique en partie les variations de Lp(a) observées entre les populations (*Kraft et al., 1996; Marcovina et al., 1996*). Cependant, quelques contre-exemples mettent en doute ces affirmations. En effet, les formes courtes d'apo(a) sont plus fréquentes dans la population européenne par rapport à la population africaine dont les taux de Lp(a) moyens sont pourtant significativement plus élevés. Les différences majeures de concentrations de Lp(a) observées entre les populations proviennent surtout de mutations nucléotidiques ponctuelles (SNPs, « Single Nucleotide Polymorphisms ») activatrices ou inhibitrices de l'expression du gène *LPA* (*Enkhmaa et al., 2016*). Par exemple, plus de SNPs activateurs mais moins de mutations se traduisant par une expression réduite d'apo(a) ont été identifiés dans les populations d'origine africaine, par rapport aux populations d'origine européenne (*Deo et al., 2011; Chretien et al., 2006*).

Une explication non génétique des différences de niveaux de Lp(a) entre Africains et Européens a également été proposée. Anuurad et ses collègues ont observé une augmentation des taux de Lp(a) spécifiques à des apo(a) de tailles moyennes (22-30 *KIV*), en association avec une élévation des marqueurs pro-inflammatoires chez les Afro-américains, mais pas chez les Américains d'origine européenne. Ainsi, leurs travaux suggèrent que des événements associés à l'inflammation pourraient contribuer aux différences interethniques des concentrations de Lp(a) (*Anuurad et al., 2008*).

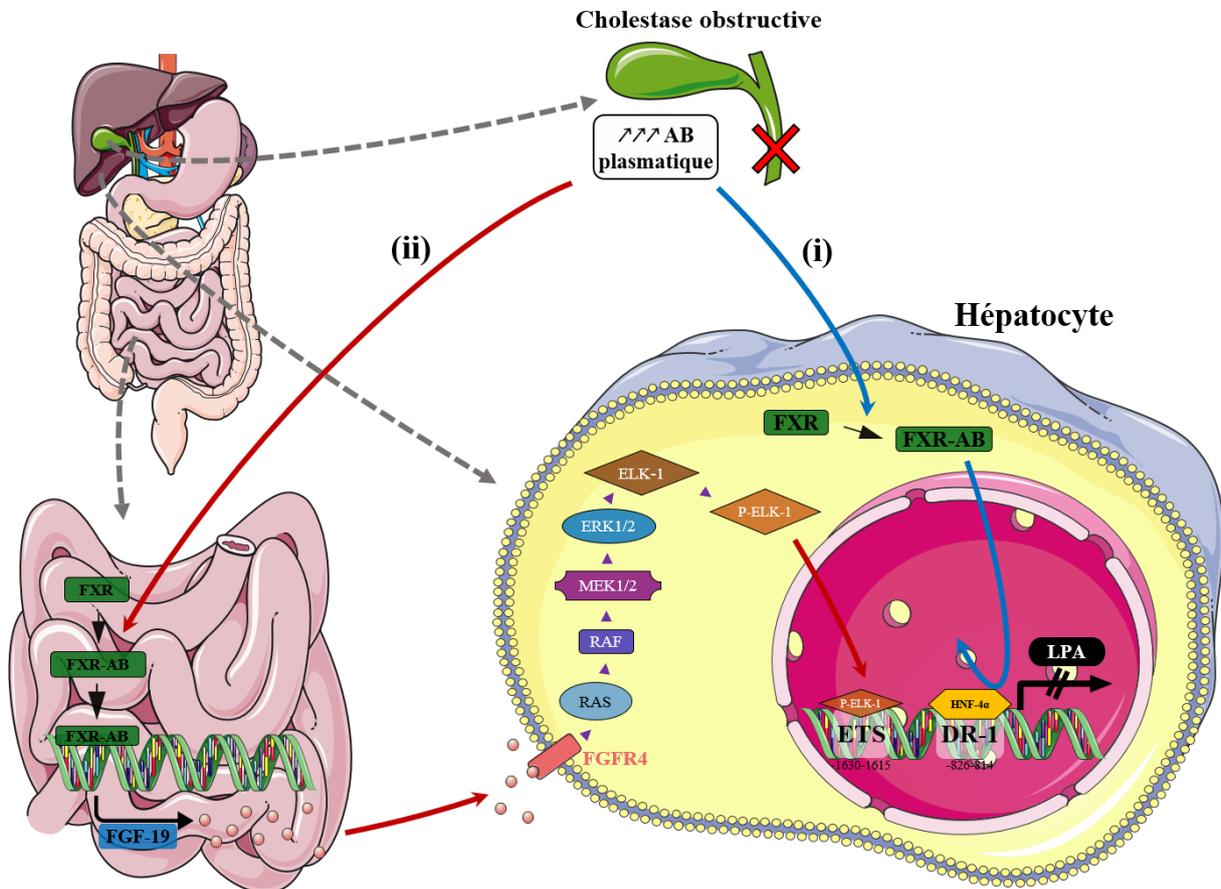
## 2.2. Régulation des concentrations plasmatiques de Lp(a)

Une caractéristique étonnante de la Lp(a) est sa large gamme de concentrations plasmatiques pouvant varier de 0,1 mg/dL à plus de 300 mg/dL dans la population générale (Kronenberg, 2019). Les niveaux de Lp(a) sont peu influencés par l'âge, le sexe, l'état de jeûne (Langsted et al., 2014) ou les styles de vie tels que le régime alimentaire ou l'activité physique (Mackinnon et al., 1997). Les différences majeures observées en terme de concentrations plasmatiques de Lp(a) entre les individus sont essentiellement déterminées par la génétique et s'expliquent principalement par des variations de la vitesse de production d'apo(a) plutôt que par des variations de sa vitesse de catabolisme (Ma et al., 2019a; Rader et al., 1994, 1993).

### 2.2.1. Les facteurs de transcription hépatiques (HNFs)

Des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription comme HNF-1 $\alpha$  (« Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\alpha$  »), HNF-4 $\alpha$  (« Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  ») ont été identifiés au niveau du promoteur du gène *LPA* (Wade et al., 1993). HNF-1 $\alpha$  est une protéine qui se lie comme dimère à son site de fixation spécifique et est un régulateur clé de l'expression d'un grand nombre de gènes hépatiques (Mendel and Crabtree, 1991). En 1994, Wade a montré sur des cellules HepG2 qu'une mutation de HNF-1 $\alpha$  abolit sa fixation au niveau du promoteur et réduit l'expression du gène *LPA* de 90%. HNF-4 $\alpha$  a également une grande influence sur l'expression d'apo(a), et les mécanismes à l'origine de ces observations ont été décrits plus en détails. L'activation de la transcription du gène *LPA* par HNF-4 $\alpha$  est réprimée par le récepteur nucléaire FXR (« Farnesoid X receptor ») *via* les acides biliaires. Cette découverte a été mise en évidence grâce à l'étude de patients souffrant de cholestase obstructive (obstruction des voies biliaires) entraînant une élévation des concentrations plasmatiques en acides biliaires et une diminution drastique de Lp(a) atteignant, dans la majorité des cas, des concentrations nulles (Chennamsetty et al., 2011). Les acides biliaires ont un double effet sur l'expression d'apo(a). Dans la première voie de régulation, l'activation de FXR par les sels biliaires entraîne sa migration vers le noyau. DR-1 est un élément de réponse situé entre les paires de bases -826 à -814 du promoteur du gène *LPA*, occupé par HNF-4 $\alpha$  à l'état basal. FXR entraîne le déplacement de HNF-4 $\alpha$  par compétition pour se fixer à DR-1 et inactiver l'expression du gène (Figure 12). La deuxième voie implique la stimulation par FXR de l'expression de FGF-19 (« Fibroblast Growth Factor 19 ») dans l'intestin. FGF-19 migre ensuite vers le foie, se lie au récepteur FGFR 4 et active la cascade de signalisation impliquant la voie RAS-RAF-MEK1/2 pour la phosphorylation d'ELK-1 en P-ELK-1. Par la suite, P-ELK-1 migre dans le noyau et se fixe à un segment

spécifique nommé ETS (« E twenty-six ») situé entre les paires de bases -1630 à -1615 du promoteur du gène *LPA*, pour diminuer son expression (Chennamsetty et al., 2012a) (Figure 13).



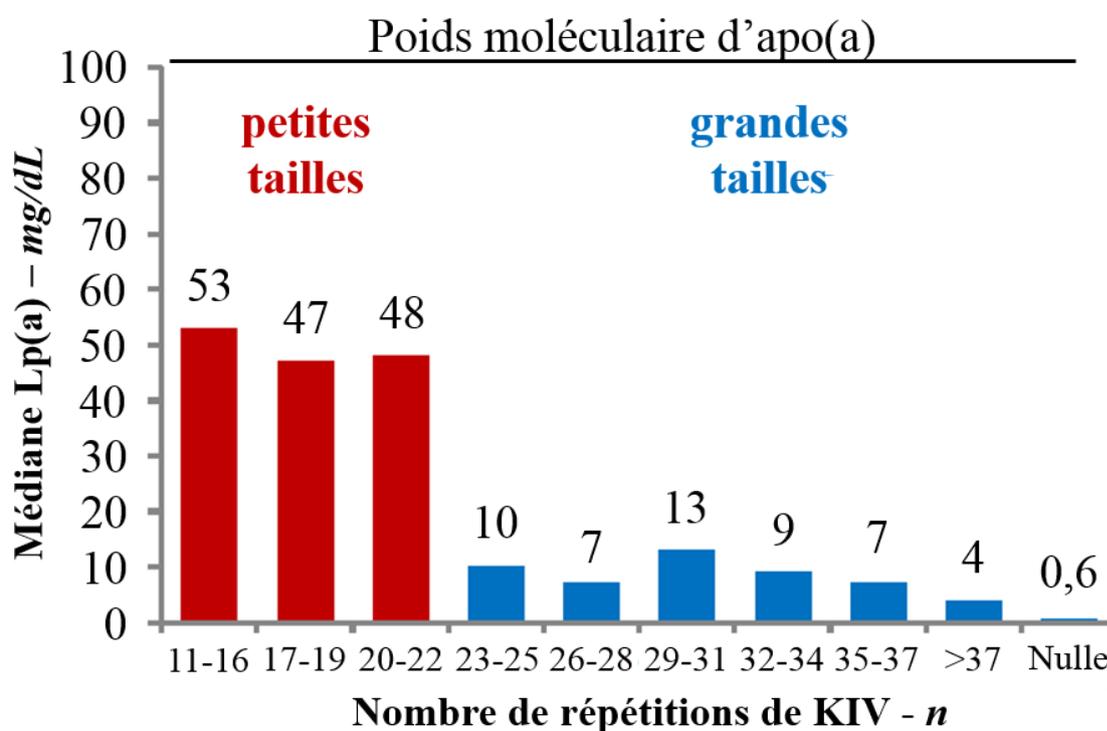
**Figure 13** – Inhibition de la biosynthèse d'apo(a) par les acides biliaires et FXR. (i) Inactivation du gène *LPA* par FXR hépatique. (ii) Inactivation du gène *LPA* par FXR intestinal. Les lignes en pointillés indiquent la vésicule biliaire, la cellule hépatique et l'intestin grêle (inspiré de Kostner et al., 2013).

## 2.2.2. Le polymorphisme du gène *LPA*

### - Le polymorphisme de taille de l'apo(a)

La découverte du polymorphisme de taille de l'apo(a) dans le sérum (Utermann et al., 1987) et du nombre de répétitions de *KIV* dans le gène *LPA* (Kraft et al., 1992a; Lackner et al., 1991, 1993) a permis d'identifier ce gène comme étant le plus influent dans la régulation des niveaux de Lp(a). Les individus exprimant un faible nombre de *KIV* codant pour des isoformes circulantes d'apo(a) dites de petites tailles (jusqu'à 22 *KIV*), ont en moyenne des taux de Lp(a) autour de 50 mg/dL (~125 nmol/L), soit environ cinq fois supérieurs aux individus ne portant

que des isoformes de grandes tailles de plus de 22 KIV avec en moyenne 10 mg/dL (~25 nmol/L) de Lp(a) (**Figure 14**) (Kronenberg, 2019).



**Figure 14** – Association entre le nombre de répétitions de KIV du gène LPA et les concentrations de Lp(a) (traduit de Kronenberg, 2019)

La relation entre le nombre de KIV et les niveaux de Lp(a) a été confirmée *in vitro*. La quantité d'apo(a) sécrétée par les cellules HepG2 transfectées ou les hépatocytes primaires de babouins dépend du nombre de KIV sur l'ADN circulaire transfecté (Brunner et al., 1996) ou sur le gène LPA endogène (Becker et al., 2006). La différence de sécrétion des isoformes de tailles distinctes s'explique principalement par le temps de transit dans la voie sécrétoire des hépatocytes. Leur temps de rétention dans le réticulum endoplasmique et le degré de dégradation présécrétoire augmentent avec la taille des isoformes d'apo(a). Ainsi, les isoformes d'apo(a) plus courtes sont sécrétées plus efficacement que les plus longues (Brunner et al., 1996; Lobentanz et al., 1998; White et al., 1997). Cette hypothèse a été confirmée dans une étude cinétique publiée récemment montrant une vitesse de production environ 50% plus élevée pour les petites isoformes d'apo(a) (< 23 KIV) par rapport aux plus grandes (≥ 23 KIV) (Chan et al., 2019). Cependant, des études épidémiologiques ont montré que la force de la corrélation inverse entre les taux de Lp(a) et le nombre de répétitions de KIV était variable selon les populations étudiées. Cette relation inverse est par exemple moins prononcée dans la population

d'origine africaine pour laquelle le polymorphisme de taille de l'apo(a) explique entre 19 et 44% de la variation de Lp(a) contre 61 et 69% dans la population d'origine européenne et environ 65% dans la population asiatique (Ali et al., 1998; Helmhold et al., 1991; Kraft et al., 1992a; Marcovina et al., 1993; Sandholzer et al., 1991, 1992; Schmidt et al., 2006). De plus, une même taille d'apo(a) est associée à des concentrations de Lp(a) pouvant varier jusqu'à 100 fois dans la population générale mais que de 2,5 fois au sein d'une même famille (Perombelon et al., 1994; Puckey et al., 1997) indiquant que les concentrations de Lp(a) ne sont pas seulement déterminées par le nombre de répétitions de *KIV-2* du gène *LPA*.

#### - Le polymorphisme de répétitions du pentanucléotide « TTTTA »

De nombreuses études visant à identifier les variations de séquences du gène *LPA*, autres que le polymorphisme de taille, ont été menées dans le but de comprendre les variations des concentrations plasmatiques de Lp(a) non expliquées par le nombre de *KIV-2*.

Un polymorphisme de répétitions entre 1 et 12 fois de la séquence pentanucléotidique « TTTTA » a été identifié dans la région du promoteur à -1373 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène *LPA* (Wade et al., 1993). Des niveaux plus élevés de Lp(a) sont associés à la présence d'allèles avec un faible nombre de répétitions TTTTA, qui expliqueraient entre 3 et 14% des niveaux circulants de Lp(a) dans la population européenne (Trommsdorff et al., 1995). Toujours chez les Européens, les allèles avec 10 ou 11 répétitions de TTTTA se sont révélés être en déséquilibre de liaison, c'est-à-dire associés génétiquement avec les allèles présentant un faible nombre de *KIV-2* ce qui contraste avec la corrélation inverse généralement observée entre le nombre de *KIV-2* et les niveaux de Lp(a) (Mooser et al., 1995). Cependant, ces observations sont controversées suite à des analyses *in vitro* de l'activité du promoteur du gène *LPA* en fonction du nombre de TTTTA. Ces observations ont suggéré que ce polymorphisme n'était pas associé directement aux taux de Lp(a), car aucune différence n'a été observée dans l'expression d'allèles de *LPA* avec un nombre variable de TTTTA (Bopp et al., 1995; Mancini et al., 1995).

#### - Les SNPs de la région *LPA*

De nombreux SNPs ont été identifiés au niveau ou à proximité du gène *LPA*. Leur présence influence considérablement les niveaux de Lp(a) en les augmentant (mutations activatrices) ou en les réduisant (mutations inhibitrices). D'autres SNPs peuvent également entraîner une absence totale d'expression d'apo(a).

**SNPs activateurs du gène *LPA*** – La substitution nucléotidique G>A située en position +121 de la région 5' du gène *LPA*, est associée à une augmentation des taux de Lp(a) en raison d'une plus forte activité transcriptionnelle (Ichinose and Kuriyama, 1995; Prins et al., 1999; Suzuki et al., 1997). Dans la population afro-américaine, ce variant est fortement associé aux tailles intermédiaires d'apo(a) (24-28 KIV), alors qu'il est plutôt associé à de longues isoformes d'apo(a) contenant 33 et 34 KIV chez les Américains d'origine européenne. Cette observation pourrait expliquer en partie les concentrations plus élevées de Lp(a) observées chez les Africains (Chretien et al., 2006). Deux autres SNPs, rs3798220 (T>C) et rs10455872 (A>G) situés au niveau du gène *LPA* et principalement retrouvés sur les petites isoformes d'apo(a) (17 à 21 KIV), ont également été largement étudiés. Rs3798220 est situé dans le domaine protéase et rs10455872 dans l'intron du domaine *KIV-7*. Ces deux SNPs sont associés à des concentrations élevées de Lp(a) et expliqueraient ensemble jusqu'à 36% de la variation des niveaux de Lp(a) dans la population européenne (Clarke et al., 2009). Un autre SNP rs186696265 localisé au niveau des régions « enhancers » entre le gène *LPA* et le gène *PLG*, entraîne une augmentation des taux de Lp(a) de 65 mg/dL ou de 48 mg/dL après ajustement de l'effet d'autres SNPs, ainsi qu'une augmentation de 73% du risque de maladies coronariennes (Mack et al., 2017). Récemment, des chercheurs ont identifié pour la première fois deux SNPs ayant un effet synergique [rs1800769 (G>A) et rs9458001 (C>T)], situés respectivement sur le promoteur et sur une région « enhancer » du gène *LPA*. Les haplotypes [C-G], [C-A] et [T-G] n'ont pas d'effet sur l'expression de *LPA*. En revanche, l'haplotype [T-A] retrouvé dans environ 3% de la population, entraîne une élévation par trois des taux plasmatiques de Lp(a) et par 1,84 du risque de survenue de maladies coronariennes par rapport à l'haplotype le plus fréquent [C-G]. La présence combinée de ces deux variants pourrait favoriser les interactions entre la région amplificatrice et le promoteur et augmenterait ainsi fortement l'expression génique de *LPA* (Zeng et al., 2019).

**SNPs inhibiteurs du gène *LPA*** – Rs1853021 est un SNP inhibiteur de la région 5'-UTR du gène *LPA* dont la substitution C à T introduit un codon d'initiation (ATG) alternatif. *In vitro*, la présence de ce SNP se traduit par une traduction de la protéine réduite de 60% par rapport au type sauvage (Suzuki et al., 1997; Zysow et al., 1995). Les allèles non exprimés (allèles nuls) du gène *LPA*, se caractérisent par une absence totale d'apo(a) circulante ou une modification structurelle de la protéine, empêchant sa détection par les techniques immunologiques traditionnelles. Ces allèles nuls sont présents dans toutes les populations avec une fréquence plus élevée chez les Européens, et sont répartis de manière relativement homogène sur la

gamme du polymorphisme de taille de l'apo(a) (Kraft et al., 1996). Le SNP rs41272114 (G>A) est une mutation située au niveau de l'intron du *KIV-8* qui entraîne le saut des 64 dernières bases du premier exon. Cette modification se traduit par un décalage du cadre de lecture de l'ARN messager menant à un codon stop prématuré et à une apo(a) tronquée au niveau du *KIV*<sub>8</sub>. La perte du site de reconnaissance aux lysines du *KIV*<sub>8</sub> et surtout l'absence du *KIV*<sub>9</sub>, ne permettent pas la liaison apo(a)-apoB100 nécessaire à la formation de la Lp(a). La présence de ce SNP est associée à une réduction moyenne des taux de Lp(a) d'environ 12 mg/dL. Cet effet modéré s'explique par la présence de ce SNP uniquement sur des allèles *LPA* de grandes tailles (> 30 *KIV*) associés généralement à des plus faibles concentrations de Lp(a). (Kyriakou et al., 2014; Maio et al., 2019). Le variant « p.Arg21Ter » résulte d'un SNP non-sens (C>T) retrouvé uniquement au niveau du sous-type *KIV-2A* de la région *KIV-2*. Cet allèle nul entraîne aussi l'expression d'une apo(a) tronquée et incapable de se lier à l'apoB100 (Parson et al., 2004). Ce SNP est en déséquilibre de liaison presque parfait, c'est-à-dire retrouvé de manière quasi systématique avec le SNP rs41272114 cité précédemment, créant des allèles *LPA* « doubles nuls » qui sont ainsi inactivés par deux mutations indépendantes (Maio et al., 2019). Contrairement à la mutation G>A du SNP rs41272114, la mutation inactivatrice G4925A localisée au niveau du site d'épissage 5' du deuxième exon du *KIV-2*, est principalement associée à de petits allèles *LPA* avec moins de 24 *KIV*. Cette mutation augmenterait le temps de rétention de l'ARN messager et induirait une dégradation accélérée de celui-ci avant sa migration vers le réticulum endoplasmique. La variation G4925A du SNP rs75692336 (proxy) est retrouvée chez environ un individu sur cinq dans la population européenne et sa présence entraîne une réduction moyenne de Lp(a) plus importante (-31 mg/dL) que celle engendrée par la mutation rs41272114. Cette disparité de réduction s'explique par la distribution différentielle de ces deux variations sur la gamme du polymorphisme de taille du gène *LPA*. En effet, G4925A est associée à des allèles courts (< 25 *KIV*) naturellement plus exprimés que les allèles de longues tailles (> 30 *KIV*) avec lesquels rs41272114 est plus fréquemment associé. Par ailleurs, G4925A induit une diminution d'environ 20% du risque de survenue de maladies cardiovasculaires par rapport aux individus porteurs d'allèles *LPA* de courtes tailles non mutés (< 23 *KIV* ou < 14 *KIV-2*) (Coassin et al., 2017).

Ensemble, ces études ont démontré qu'environ 70 à 90% des variations des niveaux de Lp(a) peuvent être déterminées par le gène *LPA*, suggérant un modèle d'hérédité co-dominante. Ainsi, chaque individu possède deux allèles *LPA* provenant de ses deux parents et codant pour deux isoformes d'apo(a) dont les concentrations dépendent principalement du polymorphisme de

taille et des diverses mutations retrouvées dans la région du gène *LPA* ou potentiellement sur d'autres chromosomes (Kraft et al., 1992b). Certains individus n'expriment aucune ou une seule isoforme (mutations nulles) alors que d'autres possèdent deux isoformes de tailles identiques.

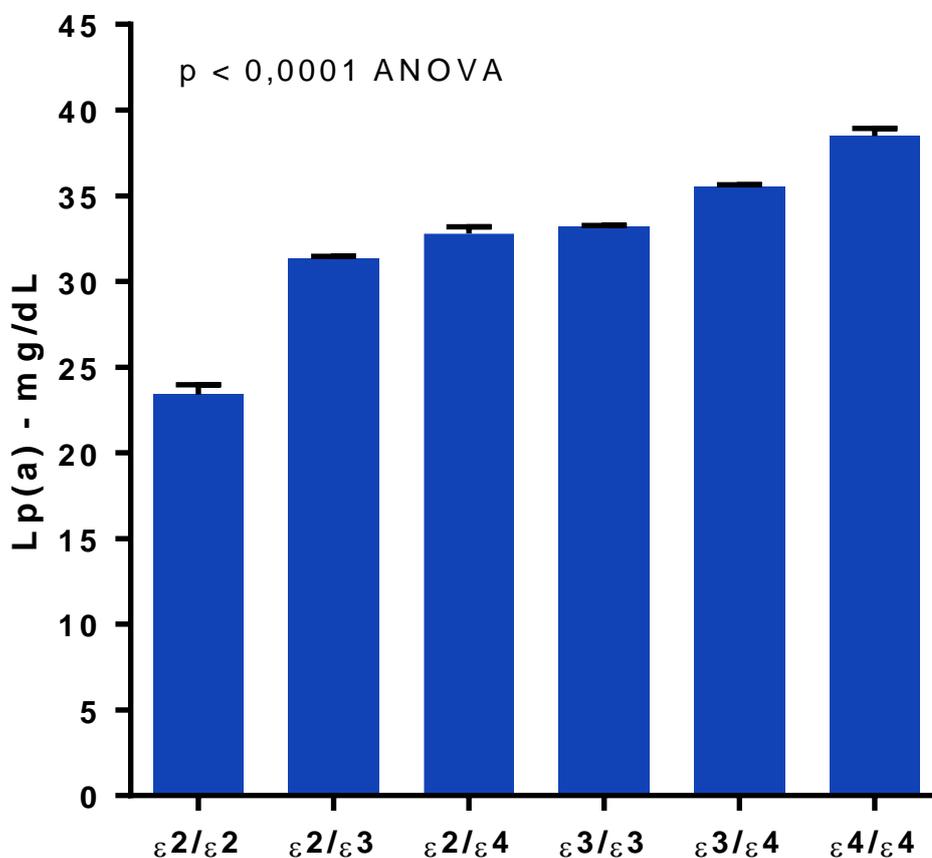
### 2.2.3. Polymorphisme de l'apolipoprotéine E et Lp(a)

À ce jour, la plupart des études n'ont pas identifié de gènes modifiant les taux de Lp(a) en dehors du locus *LPA*, à l'exception de variations génétiques sur les gènes *APOE* et *PCSK9*.

Des études antérieures évaluant l'association des variants majoritaires du gène *APOE* avec les concentrations de Lp(a) ont montré des résultats discordants (Moriarty et al., 2017; Kritharides et al., 2017; de Knijff et al., 1991). Les GWAS (« Genome Wide Association Studies ») ou « études d'association pangénomique » permettent d'analyser de nombreuses variations génétiques chez un grand nombre d'individus, afin d'étudier leurs influences sur les taux de Lp(a). Toutes les GWAS ayant investigué l'effet du gène *APOE* sur la Lp(a), suggèrent que l'allèle  $\epsilon 2$  [rs7412 (C>T)] est associé à une diminution des concentrations de Lp(a) par rapport à l'allèle  $\epsilon 3$ , mais aucune ne montre un effet significatif de l'allèle  $\epsilon 4$  [rs429358 (T>C)]. Erhart a montré que, contrairement à ce dernier, l'allèle  $\epsilon 2$  avait une influence significative sur les différences de concentrations de Lp(a) observées entre les Finnois et la population d'Europe Centrale (Erhart et al., 2018). La GWAS réalisée par Mack sur les données de 7 772 Autrichiens et Allemands confirme ces observations et montre que les concentrations en Lp(a) des individus porteurs de ce SNP étaient plus basses de 10 mg/dL pour les homozygotes ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ) et de 5 mg/dL pour les hétérozygotes ( $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ), par rapport aux individus  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Deux autres SNPs, autres que rs429358 ( $\epsilon 4$ ), du gène *APOE* dont les localisations exactes n'ont pas été mentionnées par les auteurs, semblaient également être impliqués dans la régulation de la Lp(a) (Mack et al., 2017). Une autre GWAS réalisée par Li sur une cohorte de 2 895 Américains d'origine africaine, renforce l'hypothèse d'une régulation à la baisse de la Lp(a) par l'allèle  $\epsilon 2$ . Cette étude a également mis en évidence l'influence significative du SNP rs769455 (C>T) à l'origine de la mutation Arg163Cys de l'apoE, sur la réduction des taux de Lp(a) (Li et al., 2015).

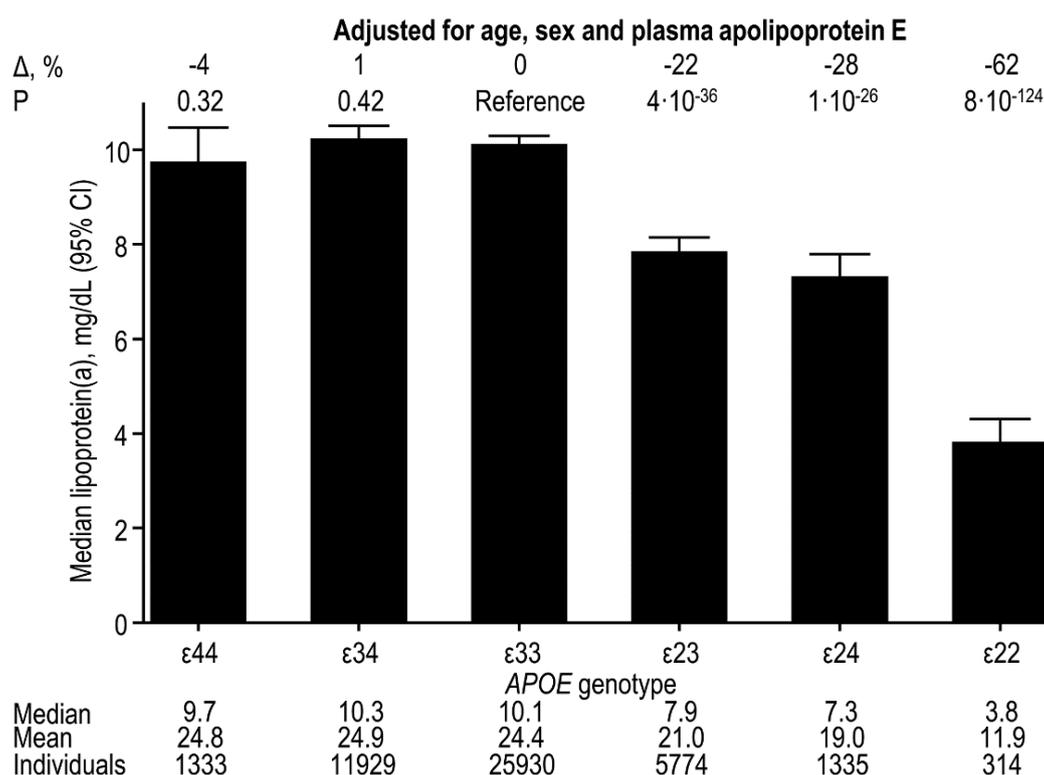
Outre les GWAS, la relation entre le gène *APOE* et la Lp(a) a également été investiguée par l'intermédiaire d'études observationnelles sur de larges cohortes ou sur des cohortes de petites tailles avec des populations plus ciblées. Les deux études transversales réalisées sur le plus grand nombre d'individus ont rendu des résultats différents. La méta-analyse de Moriarty sur 431 239 individus en population générale a montré que les niveaux moyens de Lp(a) étaient

65% plus élevés pour les génotypes  $\epsilon 4/\epsilon 4$  par rapport aux génotypes  $\epsilon 2/\epsilon 2$ , et augmentaient de manière significative selon l'ordre des génotypes *APOE* suivant :  $\epsilon 2/\epsilon 2 < \epsilon 2/\epsilon 3 < \epsilon 2/\epsilon 4 < \epsilon 3/\epsilon 3 < \epsilon 3/\epsilon 4 < \epsilon 4/\epsilon 4$  (Moriarty et al., 2017) (Figure 15).



**Figure 15** – Variation des niveaux de Lp(a) chez 431 239 individus (méta-analyse) en fonction du génotype *APOE* (extrait de Moriarty et al., 2017).

L'étude de Kritharides sur 46 615 Danois a montré que les concentrations de Lp(a) ajustées pour l'âge, le sexe et les concentrations en apoE étaient plus faibles de 22%, 28% et 62% chez les individus  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$  et  $\epsilon 2/\epsilon 4$  par rapport aux individus  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Les individus  $\epsilon 4/\epsilon 4$  présentaient des taux non significativement différents par rapport aux individus  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (Kritharides et al., 2017) (Figure 16).



**Figure 16** – Variation des niveaux de Lp(a) chez 46 615 Danois en fonction du génotype APOE (extrait de [Kritharides et al., 2017](#)). P : p value ; Δ, % : pourcentage de différence de concentration médiane par rapport au génotype ε3/ε3.

Deux études ont également montré un effet de l'APOE dépendant de la taille de l'apo(a). La première réalisée sur une population caucasienne de 466 individus a montré que l'effet de l'APOE sur les niveaux de Lp(a) n'était observé que chez les sujets porteurs d'une apo(a) de grande taille ([Klausen et al., 1996](#)). La deuxième réalisée plus récemment sur une population afro-américaine de 231 individus, indique que la réduction des niveaux de Lp(a) chez les individus porteurs de l'allèle ε2, n'était observée que chez les sujets avec une taille d'apo(a) supérieure à 26 KIV ([Anuurad et al., 2007](#)).

Les mécanismes par lesquels le gène APOE régulerait les taux plasmatiques de Lp(a) ne sont pas connus. La possibilité d'un « effet de gène » par une interaction directe au niveau des chromosomes semble très peu probable, car les gènes LPA et APOE sont situés sur différents chromosomes. L'hypothèse formulée par Yeang suggère une différence de catabolisme de la Lp(a) via les récepteurs sensibles à l'apoE. Il semblerait que l'apoE4 se lie préférentiellement aux lipoprotéines riches en triglycérides et présente une forte affinité pour le LDLR et le LRP ce qui diminuerait leur disponibilité pour la clairance de la Lp(a). A l'inverse, le LDLR et le LRP sont moins bien reconnus par l'apoE2 et seraient ainsi plus disponibles pour la capture et l'endocytose de la Lp(a). Cela pourrait également signifier qu'en présence d'apoE2, le

catabolisme de l'apo(a) dans les lysosomes après endocytose par ces récepteurs, serait favorisé au détriment de son recyclage par PlgRKT (Moriarty et al., 2017; Yeang et al., 2017). Cependant, en raison de la particularité de la Lp(a), dont les concentrations sont essentiellement régulées au niveau de sa production, l'hypothèse d'un effet de l'apoE et de ses variants sur la régulation de sa synthèse est plus vraisemblable. Dans une étude réalisée sur des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, Lindahl suggère que les différences des taux de Lp(a) observées entre les différents génotypes *APOE*, s'expliqueraient par la capacité de chaque variant d'apoE à réguler la conversion de VLDL en LDL, nécessaires à la formation de la Lp(a) (Lindahl et al., 1994).

Cependant, certains travaux réalisés sur de plus petites populations, notamment d'origine espagnole, chinoise et américaine, n'ont montré aucun effet significatif du gène *APOE* sur les niveaux de Lp(a) (Boomsma et al., 2000; Heng et al., 1995; Muros and Rodríguez-Ferrer, 1996; Schaefer et al., 1994). Ces études suggèrent que l'effet de l'*APOE* sur la Lp(a) pourrait dépendre de facteurs génétiques encore inconnus, propres à chaque population.

#### 2.2.4. PCSK9

En plus des gènes *LPA* et *APOE*, *PCSK9* semble être le seul autre locus associé à la régulation des niveaux plasmatiques de Lp(a). La relation entre PCSK9 et la Lp(a) a été établie en 2012 par Stein lors d'un essai clinique de phase I pour le développement d'un inhibiteur de PCSK9 pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Jusqu'alors, aucun médicament hypolipémiant à l'exception de la niacine, des fibrates ou des Omega 3, ne permettait de réduire sensiblement les taux plasmatiques de Lp(a). Pour la première fois en 2012, une étude a démontré qu'en plus de la réduction attendue des niveaux de LDL cholestérol, l'inhibition de PCSK9 pouvait diminuer significativement la Lp(a) (Stein et al., 2012). Outre ces observations, les travaux de Tavori ont permis de montrer que chez les sujets présentant des taux extrêmement élevés de Lp(a), PCSK9 se liait préférentiellement à la Lp(a) plutôt qu'aux LDL. Dans cette même étude, les taux de PCSK9 circulants étaient positivement corrélés ( $r = 0,50$  ;  $p < 0,0001$ ) aux taux de Lp(a) (Tavori et al., 2016a). De plus, une étude a récemment montré que dans une population d'Afro-américains, les sujets porteurs d'au moins une des deux mutations LOF de *PCSK9* Tyr142Ter (rs67608943) et Cys679Ter (rs28362286) avaient en moyenne 19 nmol/L (~8 mg/dL) de Lp(a) en moins que les sujets non porteurs (Mefford et al., 2019). Une autre variation LOF de *PCSK9*, Arg46Leu (rs11591147) présente chez les caucasiens semble également être associée à une diminution des taux de Lp(a). Dans une étude de Langsted réalisée sur 103 083

individus, les concentrations de Lp(a) étaient faiblement mais significativement plus basses chez les porteurs homozygotes (8 mg/dL) et hétérozygotes (9 mg/dL) par rapport aux non porteurs de la mutation (10 mg/dL) (Langsted et al., 2016). A l'inverse, il semble que les mutations GOF de *PCSK9* soient associées à une élévation de la Lp(a) circulante. En effet, les travaux de Tada ont montré que les 42 patients atteints d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote due à une mutation GOF de *PCSK9*, présentaient des taux de Lp(a) plus élevés que les 4015 sujets sains (21 mg/dL vs. 12 mg/dL respectivement). Aucune différence n'a cependant été observée entre les concentrations de Lp(a) des 42 patients avec une mutation de *PCSK9* et les 198 patients avec une mutation du *LDLR*, suggérant que les mécanismes à l'origine de l'élévation de la Lp(a) dans ces deux formes d'hypercholestérolémie familiale, pourraient être similaires (Tada et al., 2016).

A l'instar de l'apoE et de ses variants, les voies métaboliques par lesquelles *PCSK9* régule les taux de Lp(a) n'ont pas été découvertes. Certains chercheurs suggèrent que *PCSK9* peut moduler l'absorption de la Lp(a) *via* le *LDLR* lorsque celui-ci est surexprimé au niveau du foie notamment après un traitement aux inhibiteurs de *PCSK9* (Raal et al., 2016; Romagnuolo et al., 2015; Watts et al., 2018). Pourtant, même à de fortes doses, les statines qui font baisser les taux de LDL cholestérol en augmentant notamment l'expression du *LDLR* à la surface des hépatocytes, ne diminuent pas la Lp(a) (Tsimikas et al., 2019). *PCSK9* pourrait également moduler la production de Lp(a). Tavori suggère qu'en plus de diminuer la clairance hépatique des lipoprotéines *via* l'inhibition du *LDLR*, *PCSK9* pourrait aussi à l'aide de l'apoE et du *LDLR*, activer la lipogénèse au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel et favoriser ainsi la synthèse d'apo(a) et de Lp(a) (Tavori et al., 2016a). Dans la continuité de cette hypothèse, les travaux de Villard ont montré que la sécrétion de Lp(a) par des hépatocytes humains primaires est augmentée par *PCSK9*. Cette sécrétion était ensuite atténuée grâce à un inhibiteur de *PCSK9* (Villard et al., 2016).

### 2.2.5. L'influence de certaines pathologies sur les taux de Lp(a)

#### - Les pathologies rénales

Le syndrome néphrotique et l'insuffisance rénale terminale augmentent de deux à trois fois les niveaux de Lp(a) par des mécanismes différents (Hopewell et al., 2018). Les patients atteints de syndrome néphrotique présentent des concentrations plasmatiques excessivement élevées de Lp(a) qui peuvent être réduites avec des thérapies anti-protéïnuriques (Gansevoort et al., 1994; Stenvinkel et al., 1993; Wanner et al., 1993). Les mécanismes sous-jacents à ces élévations ne

sont pas clairement élucidés mais l'hypothèse la plus probable semble être l'augmentation générale de la synthèse des protéines par le foie, dont l'apo(a), en raison de la perte élevée de protéines plasmatiques par le rein (Hopewell et al., 2018). Dans la logique de cette hypothèse une étude cinétique a montré que l'augmentation des concentrations plasmatiques de Lp(a) provenait exclusivement d'une élévation de sa biosynthèse plutôt qu'à un défaut de son élimination par le rein (De Sain-Van Der Velden et al., 1998). Dans la maladie rénale chronique, l'apo(a) urinaire diminue de manière significative lorsque le débit de filtration glomérulaire devient inférieur à 70 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, ce qui contribuerait à une diminution de son épuration rénale et une augmentation de ses concentrations plasmatiques.

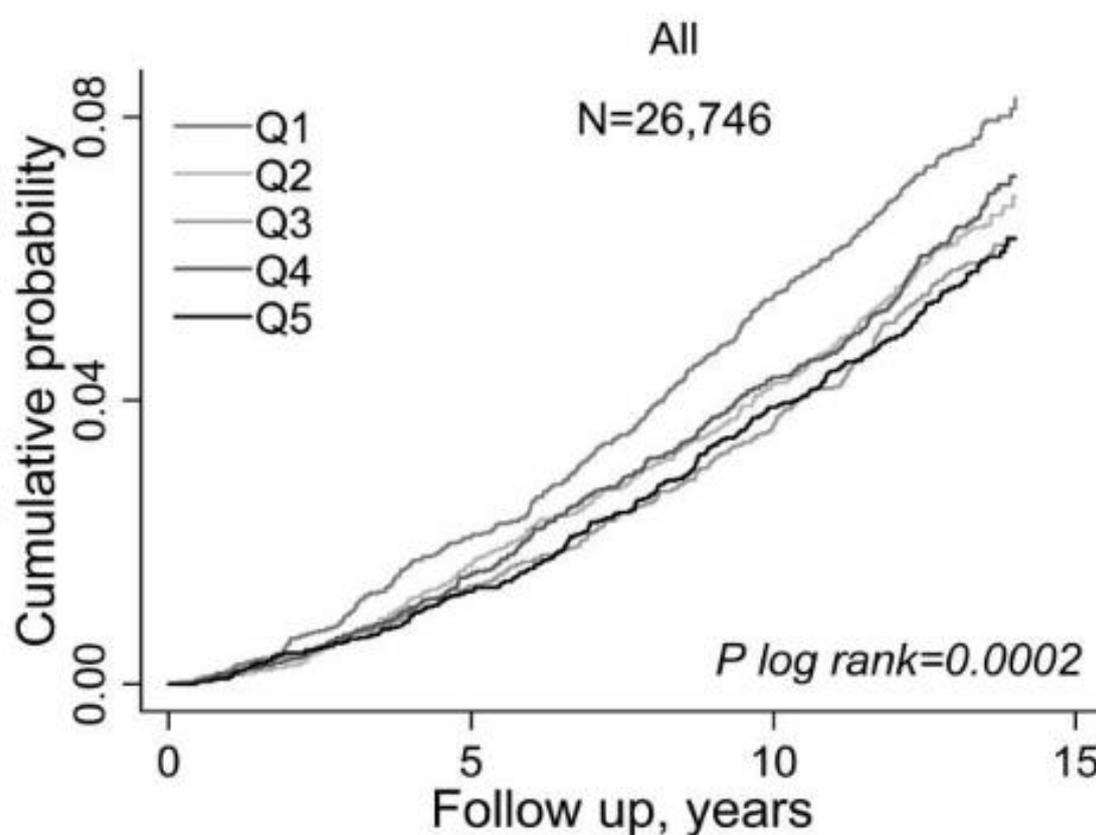
#### **- Les troubles de la fonction hépatique**

Comme les taux circulants de Lp(a) sont principalement liés au taux de synthèse de l'apo(a) au niveau hépatique, les processus physiopathologiques affectant le foie ont un effet sur la Lp(a). Ainsi, les patients atteints de cirrhose et d'hépatite ont des concentrations de Lp(a) plus faibles que les témoins sains (Irshad, 2004; Malaguarnera et al., 1995; Alessandri et al., 1994; Gregory et al., 1994). Dans son étude, Geiss a observé une réduction de 41% de la concentration de Lp(a) indépendamment de la taille de l'apo(a), chez les patients atteints d'hépatite A, B et C (Geiss et al., 1996). La consommation d'alcool a également un effet dose-dépendant sur les concentrations de Lp(a). Dans deux études, les personnes alcooliques présentaient des valeurs fortement réduites de Lp(a) jusqu'à 60% (Kervinen et al., 1991; Marth et al., 1982).

#### **- Le diabète**

À ce jour, le lien entre la Lp(a) et le diabète n'a pas été clairement élucidé et les rapports publiés à ce sujet sont contradictoires. Les premières études ont montré des concentrations plus élevées de Lp(a) chez les patients atteints de diabète de type 1 (Haffner et al., 1991; Levitsky et al., 1991), ainsi que chez les patients atteints de diabète de type 2 combiné avec une microalbuminurie (Jenkins et al., 1992). D'un autre côté, un certain nombre de grandes études « cas *versus* témoins » signalent des concentrations similaires de Lp(a) chez les patients atteints de diabète de type 1 ou de type 2 par rapport aux témoins sains (Császár et al., 1993; Haffner et al., 1992; Klausen et al., 1992; Purnell et al., 1995). Des études plus récentes ont quant à elles observées une diminution de la Lp(a) chez des patients avec un diabète de type 2 (Arsenault et al., 2018; Tsimikas, 2016)

Dans un rapport de l'étude ERIC-Norfolk, une forte corrélation inverse entre le niveau de Lp(a) et l'incidence du diabète de type 2 a été observée. Cependant, la présence du SNPs rs10455872, qui entraîne une élévation des taux de Lp(a), n'était pas associée à un risque plus faible de diabète, ce qui suggère que les concentrations de Lp(a) ne sont pas liées de manière causale à la survenue du diabète de type 2 (Ye et al., 2014). Dans une étude prospective consistant au suivi de 26 746 femmes en bonne santé pendant 13 ans, Mora et ses collègues ont trouvé une association inverse entre les concentrations de Lp(a) et le risque de diabète de type 2 avec un risque relatif inférieur de 20 à 50% pour les quintiles 2 à 5 par rapport au quintile 1 (Figure 17) (Mora et al., 2010).



**Figure 17** – Risque de diabète de type 2 en fonction des concentrations de Lp(a) (extrait de Mora et al., 2010). Q : quintile.

Une association inverse similaire a été rapportée récemment dans une cohorte de 143 087 Islandais (Gudbjartsson et al., 2019).

Le mécanisme physiopathologique qui pourrait expliquer la variation de la Lp(a) dans le diabète reste incertain. Rainwater et Haffner ont montré que les concentrations de Lp(a) étaient inversement corrélées avec les niveaux d'insuline et de glucose 2 heures après le test

d'hyperglycémie provoquée par voie orale, chez les sujets diabétiques et non diabétiques (Rainwater and Haffner, 1998). Plus récemment, une étude *in vitro* a démontré que l'insuline pouvait également inhiber la production d'apo(a) dans des hépatocytes primaires de singe, ce qui pourrait expliquer les taux de Lp(a) inférieurs mesurés chez les patients atteints de diabète de type 2 (Neele et al., 1999).

## 2.2.6. Influence des facteurs environnementaux et des situations métaboliques sur la Lp(a)

### - Les hormones

Une étude réalisée sur des femmes ménopausées suivant une thérapie hormonale de substitution a montré que les œstrogènes induisaient une réduction d'environ 37% des taux plasmatiques de Lp(a). Il semble également que l'addition de progestérone à ce traitement exacerbe la réduction de Lp(a) d'environ 10% (Schlegel et al., 1999). La testostérone est aussi associée à une réduction des taux de Lp(a) (Dionyssiou-Asteriou and Katimertzi, 1993). Pourtant, bien que les concentrations plasmatiques de testostérone soient dix fois supérieures chez l'homme par rapport à la femme, les concentrations de Lp(a) sont très peu influencées par le sexe (Erhart et al., 2018; Jenner et al., 1993; Srinivasan et al., 1991) suggérant l'effet d'autres facteurs de régulations spécifiques au sexe que les hormones. Les hormones de croissance comme la somatotropine et les hormones anabolisantes influencent également fortement les niveaux de Lp(a). La somatotropine est associée à une augmentation de Lp(a) jusqu'à 120% alors que les stéroïdes androgènes anabolisants peuvent la réduire de 70% (Hislop et al., 2001; Jawi et al., 2020).

### - L'inflammation

Le gène *LPA* contient des éléments de réponse à des facteurs inflammatoires tels que des cytokines. L'étude de Ramharack sur des hépatocytes primaires de singe a montré que la synthèse d'ARN messagers de *LPA* était fortement influencée par les niveaux plasmatiques d'interleukines 6 (IL-6), de TGF- $\beta$ 1 (« Transforming Growth Factor Beta 1 ») et de TNF- $\alpha$  (« Tumor Necrosis Factor Alpha »). Alors qu'aucun effet n'a été observé pour l'IL-2 et l'IL-8, le traitement des cellules avec de l'IL-6 a entraîné une augmentation de l'expression génique et de la sécrétion jusqu'à 350% par rapport à l'état basal (Ramharack et al., 1998). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Wade ayant identifié un élément de réponse d'IL-6 au niveau du promoteur de *LPA* (Wade et al., 1993). Cependant, certaines interleukines (IL-4, IL-13) et les cytokines TGF- $\beta$ 1 et TNF- $\alpha$  ont induit une inhibition de l'expression du gène *LPA* de plus

50% avec un effet plus marqué pour TGF- $\beta$ 1 et TNF- $\alpha$  (Ramharack et al., 1998). La protéine C-réactive (CRP) semble également être associée aux taux de Lp(a). Dans l'étude de Langsted, les concentrations médianes de Lp(a) étaient plus élevées d'environ 17% chez les sujets avec des taux de CRP supérieurs à 10 mg/L par rapport aux sujets avec des niveaux de CRP inférieurs à 1 mg/L (Langsted et al., 2014).

D'après les multiples travaux publiés sur l'association entre la Lp(a) et l'inflammation, il semble que la présence d'un état pro-inflammatoire, généré par exemple lors d'un infarctus du myocarde, puisse contribuer à des niveaux plus élevés de Lp(a) (Gheini et al., 2014; Chakraborty et al., 2013). Cependant, d'autres d'études comparant les niveaux de Lp(a) avant et après un état inflammatoire semblent nécessaires pour observer le comportement de la Lp(a) dans ces conditions.

#### - Alimentation et exercice physique

Une alimentation saine et un exercice régulier sont recommandés pour la prévention des maladies coronariennes car ces pratiques diminuent le risque cardiovasculaire lié à un mauvais profil lipidique (Fletcher et al., 2018). Malheureusement, leurs effets sur la concentration de Lp(a) sont complètement différents. A l'exception d'une étude récente qui montre qu'un régime à base de plantes diminue considérablement les biomarqueurs inflammatoires et les lipoprotéines athérogènes, y compris la Lp(a) de 32 nmol/L (~13 mg/dL) en moyenne (Najjar et al., 2018), la majorité des études transversales et interventionnelles montre que la concentration plasmatique de Lp(a) est régulée indépendamment du régime alimentaire, des autres classes de lipoprotéines et de l'exercice physique intense et à long terme (Hirowatari et al., 2017), bien que ces activités améliorent le profil lipidique incluant notamment les niveaux de cholestérol total, de triglycérides, de LDL cholestérol et de HDL cholestérol (Lichtenstein et al., 1993; Mackinnon et al., 1997).

En conclusion, jusqu'à 90% des taux circulants de Lp(a) s'expliquent par le gène *LPA* lui-même, ce qui fait de la Lp(a), la lipoprotéine avec le contrôle génétique de très loin le plus important (Austin et al., 1992; Lamon-Fava et al., 1991). A côté des gènes *APOE* et *PCSK9*, qui ont aussi un rôle indéniable sur les niveaux plasmatiques de Lp(a), beaucoup d'autres facteurs semblent les faire varier mais les études sont pour la plupart limitées et contradictoires.

## 2.3. Lp(a) et maladies cardiovasculaires

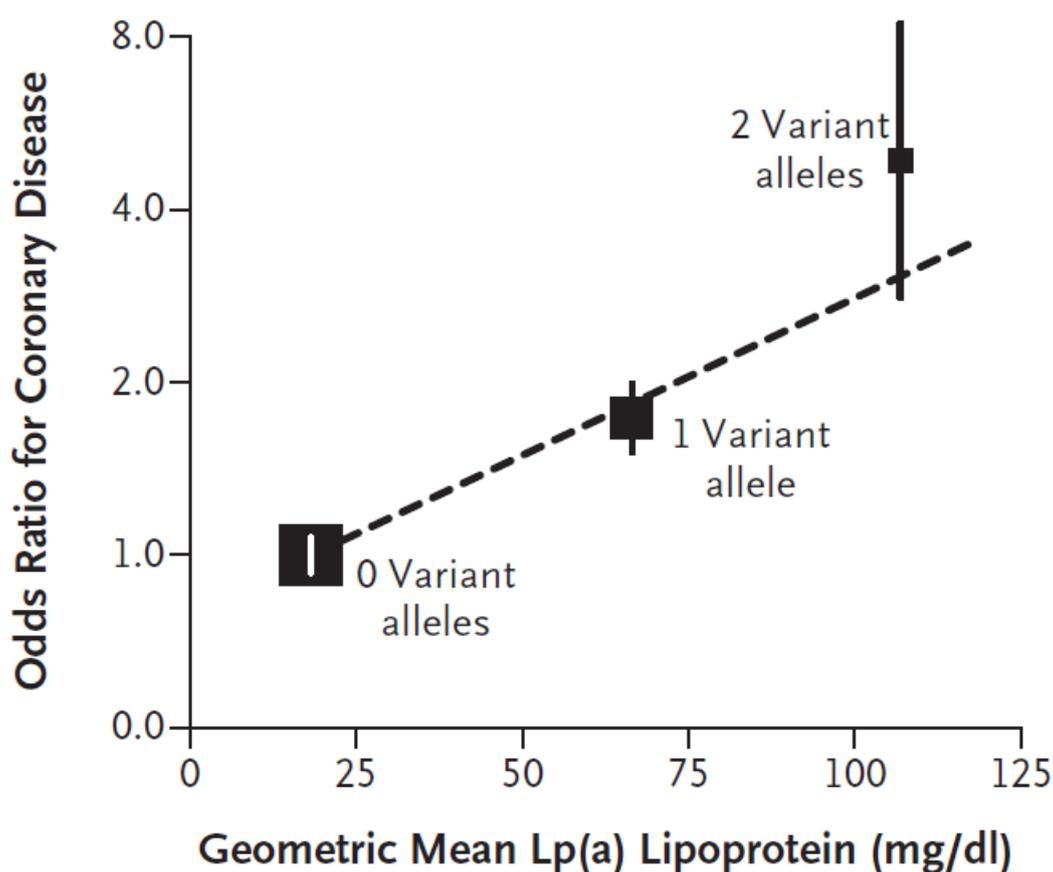
Depuis le début des années 2010, de vastes études épidémiologiques et génétiques ont véritablement permis d'établir un lien causal entre des niveaux élevés de Lp(a) et l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires, notamment liées à l'athérosclérose. Parmi celles-ci, les plus documentées sont l'infarctus du myocarde (Kamstrup et al., 2012), l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (Hopewell et al., 2011; Laschkolnig et al., 2014), ainsi que la sténose de la valve aortique (Thanassoulis et al., 2013) dont la progression est fortement accélérée lorsque les concentrations circulantes de Lp(a) sont élevées. La Lp(a) serait également associée au risque d'accident vasculaire cérébral mais les données publiées jusqu'à présent ne permettent pas de valider cette hypothèse avec certitude (Gurdasani et al., 2012; Helgadottir et al., 2012).

### 2.3.1. Lp(a) et maladies cardiovasculaires athérosclérotiques

#### - Risque athérosclérotique cardiaque et des membres périphériques

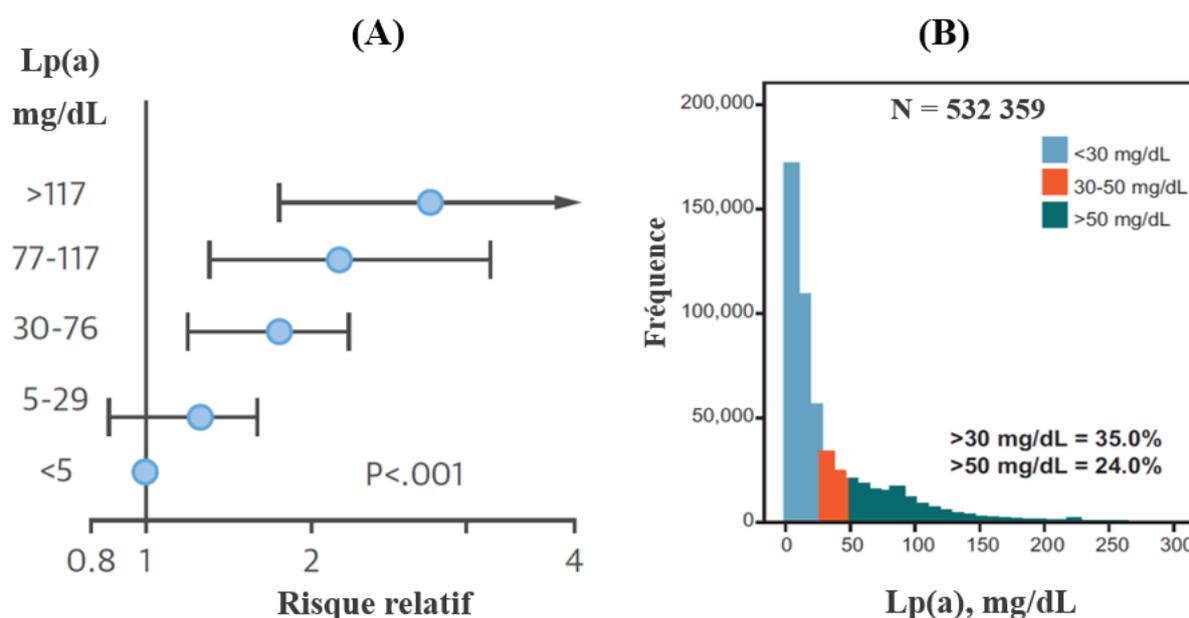
Suite à la découverte de la Lp(a) par Berg, les premières études rétrospectives « cas-témoins » ont montré que ses taux plasmatiques étaient élevés chez les patients atteints de coronaropathies (Albers et al., 1977; Kostner et al., 1981; Rhoads et al., 1986). Cependant, ces études ont été discutées puisqu'elles ne pouvaient pas exclure que la Lp(a) était simplement un marqueur du processus de progression des plaques athéromateuses ou que les niveaux de Lp(a) augmentaient en conséquence d'une maladie athérothrombotique. De plus, suite à l'étude publiée par Ridker, Hennekens et Stampfer en 1993, la recherche clinique sur la Lp(a) a connu un ralentissement. Leur étude prospective sur 14 916 hommes ne montrait aucune différence de concentrations de Lp(a) entre les sujets ayant été victimes d'infarctus du myocarde et les sujets sains (Ridker et al., 1993). Cependant, cette étude et les précédentes ont été critiquées par la présence de nombreux facteurs confondants, y compris le manque de méthodes normalisées pour la mesure de la concentration de Lp(a), le stockage inapproprié des échantillons de plasma ou de sérum et le biais des mesures de Lp(a) par les méthodes immunologiques dû à la taille des isoformes de l'apo(a), de telle sorte que les concentrations des petites isoformes étaient sous-estimées et les concentrations des grandes isoformes étaient surestimées (Boffa and Koschinsky, 2019). A partir des années 2000, l'amélioration et l'harmonisation des techniques de dosage de la Lp(a) a permis la publication de résultats plus robustes. En 2009, la publication de trois rapports majeurs a renforcé l'hypothèse selon laquelle la Lp(a) est un facteur de risque génétique, indépendant et causal des maladies coronariennes. Le premier, est une méta-analyse réalisée

sur 126 634 patients qui a montré que le risque d'infarctus du myocarde devenait significatif à partir de 30 mg/dL (~75 nmol/L) de Lp(a), et pouvait augmenté de plus de 50% pour les concentrations les plus élevées (Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2009). La GWAS de Clarke a montré que les SNPs rs3798220 et rs10455872, tous les deux activateurs du gène *LPA*, étaient associés à une augmentation significative du risque cardiovasculaire. En comparaison avec les individus sans mutations, les individus porteurs d'un de ces deux SNPs présentaient des concentrations élevées de Lp(a) ainsi qu'une augmentation du risque relatif de maladies coronariennes compris entre 1,70 et 1,92. Toujours en comparaison avec les individus sains sans mutations, le risque relatif des patients était multiplié par 2,57 lorsque ces SNPs étaient retrouvés au moins deux fois (Figure 18) (Clarke et al., 2009).



**Figure 18** – Risque relatif de maladie coronarienne en fonction de la concentration en Lp(a) et des deux SNPs rs10455872 et rs3798220 du gène *LPA* (extrait de Clarke et al., 2009). Ici, le génotype *LPA* est défini par l'absence ou la présence d'au moins un des deux SNPs rs10455872 et rs3798220 (0 allèle, 1 allèle ou au moins 2 allèles).

Dans une autre étude évaluant l'effet de la taille des allèles *LPA* dans trois cohortes danoises, la taille des allèles *LPA* était inversement corrélée aux taux plasmatiques de Lp(a), et au risque d'infarctus du myocarde (Kamstrup et al., 2009). Aujourd'hui, on estime qu'au-delà de l'intervalle compris entre 30 mg/dL (~75 nmol/L) et 50 mg/dL (~125 nmol/L), correspondant aux 70 et 80<sup>ième</sup> percentiles de la population générale, respectivement, les concentrations de Lp(a) deviennent potentiellement pathologiques (Figure 19) (Varvel et al., 2016; Nordestgaard et al., 2010; Kamstrup et al., 2009). Par ailleurs, des concentrations de Lp(a) supérieures à 200 mg/dL pourraient être associées à une multiplication par trois à quatre du risque de maladies coronariennes, ce qui représente un risque similaire à celui de l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote (Burgess et al., 2018).



**Figure 19** – (A) : Risque relatif d'infarctus du myocarde en fonction des niveaux de Lp(a) (modifié de Kamstrup et al., 2009). (B) : Fréquence de distribution des taux de Lp(a) dans une population de 532 359 individus (modifié de Varvel et al., 2016).

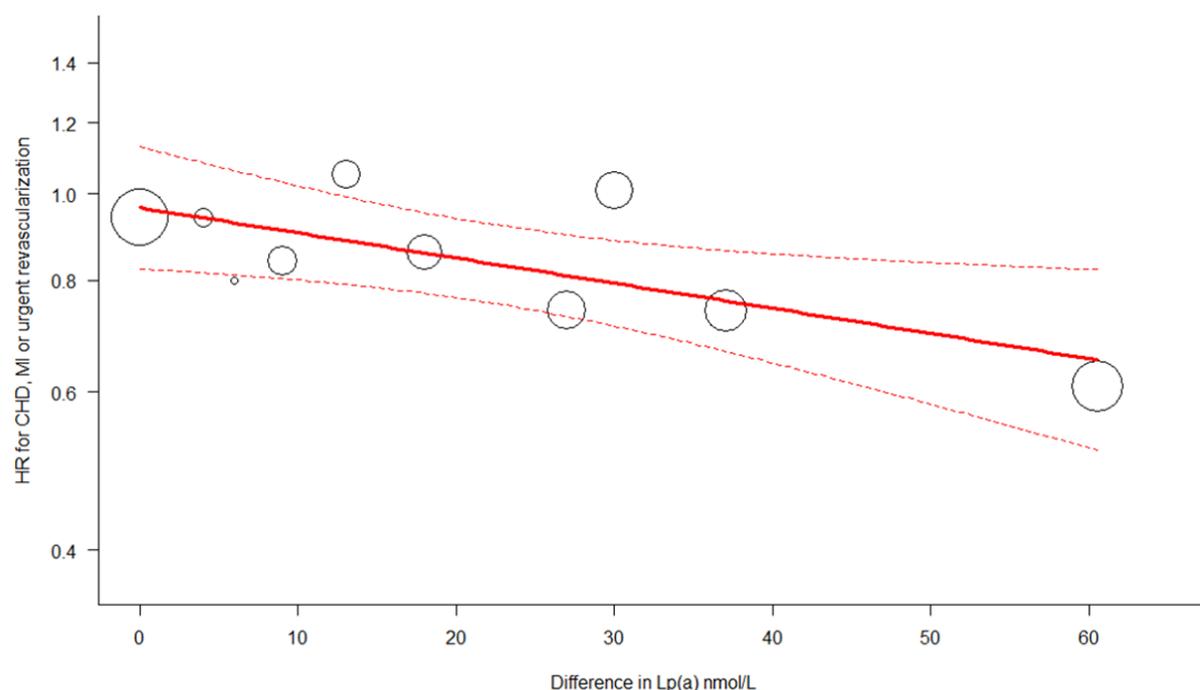
Bien que les concentrations plasmatiques de Lp(a) soient largement dépendantes de la taille de l'apo(a), une étude publiée en 2017 a montré que le nombre de répétitions de KIV<sub>2</sub> pouvait aussi être un facteur de risque pour les maladies coronariennes, indépendamment des concentrations plasmatiques de Lp(a). Ainsi, les auteurs de cette étude ont suggéré que les petites isoformes d'apo(a) pourraient être plus athérogènes que les plus longues, mais ce concept reste débattu (Saleheen et al., 2017).

### - Accident vasculaire cérébral

L'association de niveaux élevés de Lp(a) avec le risque d'accident vasculaire cérébral ischémique a été étudiée dans plusieurs études mais les résultats sont contradictoires. Parmi les études majeures, deux réalisées sur 18 720 et 9 711 patients, n'ont montré aucune association entre les niveaux de Lp(a) et le risque d'accident vasculaire cérébral tout type confondu (Canouï-Poitrine et al., 2010; Gurdasani et al., 2012). Deux autres ont cependant trouvé une augmentation faible mais significative de 21% et de 1% du risque d'accident cérébrovasculaire ischémique (Virani et al., 2012; Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2009). Ces observations ont été confirmées dans une étude publiée en 2019 montrant que les niveaux élevés de Lp(a) et les SNPs activateurs de *LPA* étaient associés à une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral ischémique de 20% (Langsted et al., 2019a). Curieusement, une autre étude récente a constaté un rôle protecteur de la Lp(a) en inhibant la lyse des caillots de sang ou en permettant une cicatrisation plus rapide des plaies (Langsted et al., 2017). Bien que les données à ce sujet manquent, les propriétés antifibrinolytiques et cicatrisantes de la Lp(a) seraient associées à un risque réduit d'événements hémorragiques dans le cerveau telles que les hémorragies méningées et intracérébrales et dans les voies respiratoires comme l'épistaxis (saignement du nez) et l'hémoptyisie (saignement au niveau des voies sous-glottiques) (Chen et al., 2019; Langsted et al., 2017), c'est pourquoi il est nécessaire de distinguer des accidents vasculaires cérébraux ischémiques et hémorragiques dans l'étude des mécanismes pathologiques de la Lp(a) en lien avec l'athérosclérose.

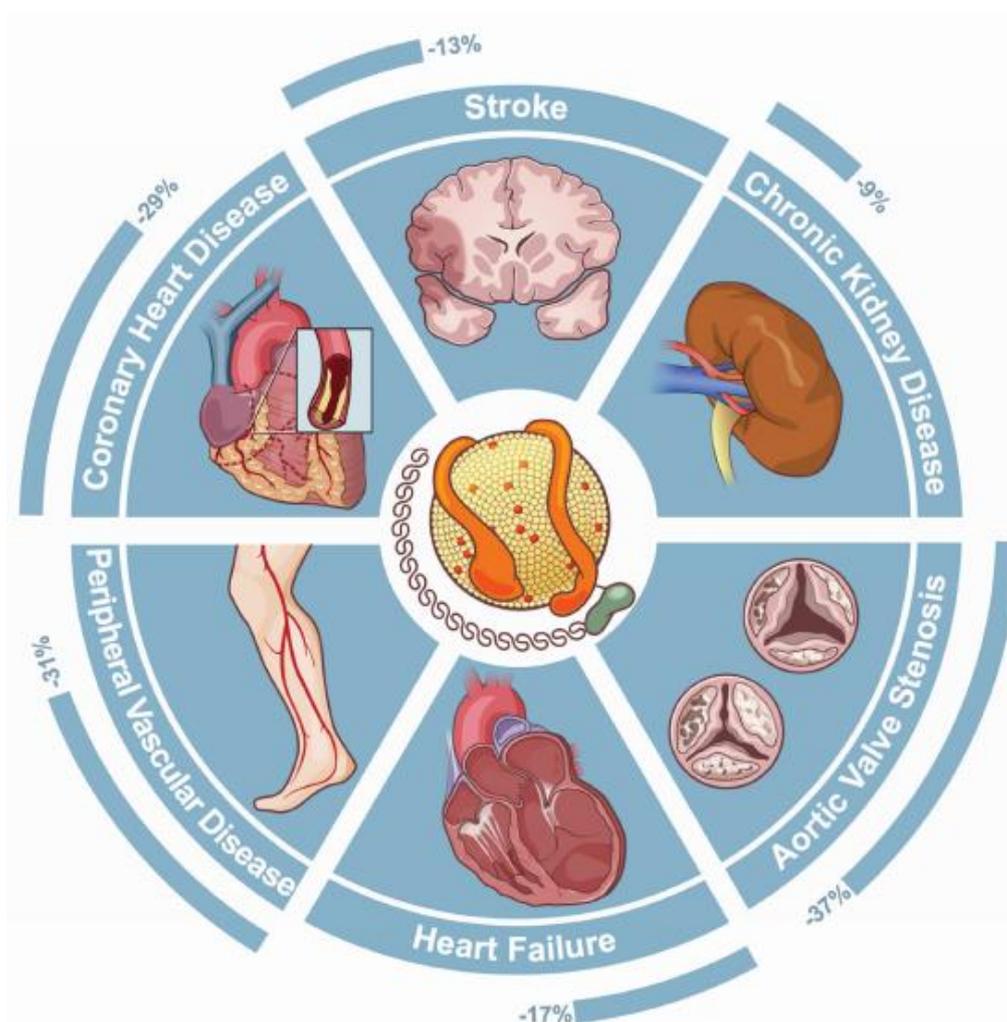
### - Faibles concentrations de Lp(a) et diminution du risque cardiovasculaire

Une autre approche pour étudier le risque cardiovasculaire lié à la Lp(a) consiste à évaluer l'effet de la diminution de la Lp(a) plasmatique. Plusieurs auteurs ont montré que l'aphérèse pouvait considérablement diminuer le nombre d'événements cardiovasculaires chez des patients atteints d'hyper-Lp(a) (Moriarty et al., 2019; Leebmann et al., 2013). Outre l'aphérèse, une étude majeure a récemment estimé qu'une diminution de 25 nmol/L de la Lp(a) par un inhibiteur de PCSK9 (evolocumab) permettait de réduire le risque de mort cardiaque, d'infarctus du myocarde et d'intervention vasculaire urgente de 15%, indépendamment de la baisse concomitante des taux de LDL cholestérol (Figure 20) (O'Donoghue et al., 2019).



**Figure 20** – Effet de la réduction absolue de Lp(a) par les inhibiteurs de PCSK9 sur le risque de maladies coronariennes (extrait de *O'Donoghue et al., 2019*). Les cercles représentent les déciles de concentrations de Lp(a) des patients avant traitement. La ligne pleine et les pointillés indiquent la courbe de tendance avec un intervalle de confiance de 95%.

Excepté ces études, et en l'absence d'essais cliniques sur des médicaments ciblant spécifiquement et uniquement la Lp(a), des chercheurs ont tenté d'estimer si des niveaux de Lp(a) bas, génétiquement déterminés, pouvaient réduire le risque de maladie cardiovasculaire. Une première étude a révélé qu'une diminution de Lp(a) engendrée par des SNPs inactivateurs induisait une réduction significative du risque de certaines maladies cardiovasculaires dont les coronaropathies et les artériopathies oblitérantes périphériques, ainsi qu'une réduction du risque d'insuffisance cardiaque et rénale chronique (**Figure 21**). Des résultats relativement similaires ont été trouvés dans plusieurs autres études. La première de Afshar en 2016, a permis d'établir qu'une réduction des niveaux de Lp(a) sous le seuil de 50 mg/dL (~125 nmol/L) pourrait prévenir l'infarctus du myocarde chez une personne sur quatorze et la sténose de la valve aortique chez une personne sur sept (*Afshar et al., 2016*). La deuxième de Madsen publiée en 2020, suggère qu'une diminution de la Lp(a) de 50 mg/dL (~125 nmol/L) pendant au moins cinq ans pourrait réduire le risque de récurrences cardiovasculaires majeures de 20% en prévention secondaire (*Madsen et al., 2020*).



**Figure 21** – Impact de la réduction d'origine génétique de la Lp(a) sur le risque de certaines maladies cardiovasculaires et d'insuffisance cardiaque et rénale chroniques (extrait de [Emdin et al., 2016](#)). Le pourcentage de réduction du risque correspond à une diminution de la Lp(a) équivalant à un écart-type. Coronary heart disease : Maladie coronarienne ; Stroke : Accident vasculaire cérébral ; Chronic kidney disease : Insuffisance rénale chronique ; Aortic valve stenosis : Sténose de la valve aortique ; Heart failure : Insuffisance cardiaque ; Peripheral vascular disease : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs.

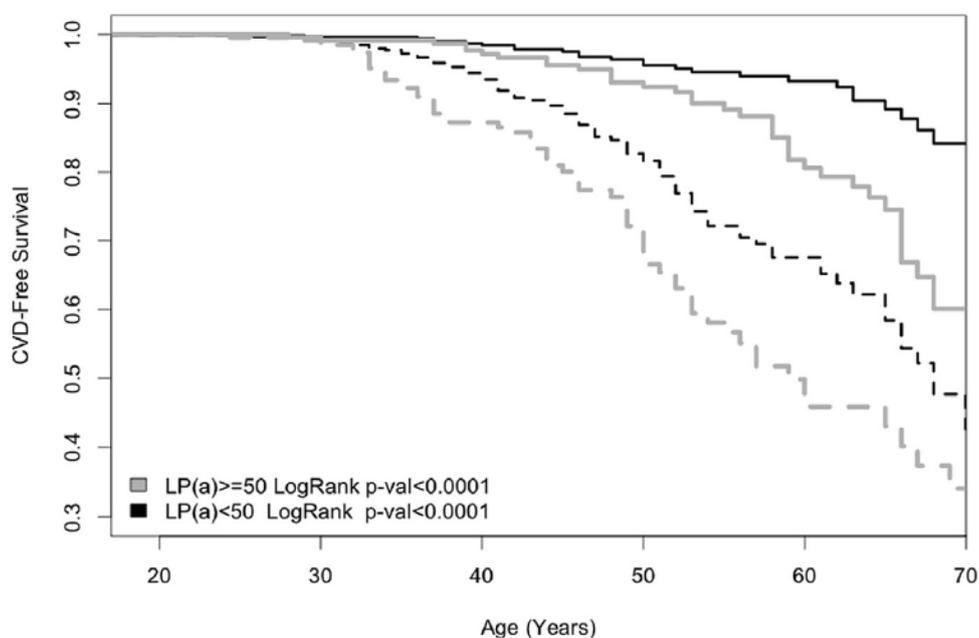
En 2018 et 2019, deux analyses de randomisation mendéliennes basées sur la même approche méthodologique ont estimé la réduction de la Lp(a) nécessaire pour diminuer le risque de maladies coronariennes équivalant à une réduction de LDL cholestérol de 1 mmol/L (38,68 mg/dL). Alors que Burgess estime cette réduction de Lp(a) à 100 mg/dL, Lamina suggère une réduction moins importante estimée à 66 mg/dL ([Burgess et al., 2018](#); [Lamina et al., 2019](#)). Une réduction aussi importante de Lp(a) n'est pas possible avec les thérapies actuelles comme la niacine et les inhibiteurs de PCSK9. Cependant, des essais cliniques sont en cours pour évaluer l'effet d'oligonucléotides anti-sens inactivant spécifiquement l'expression du gène *LPA* ([Tsimikas et al., 2020](#); [Viney et al., 2016](#); [Tsimikas et al., 2015](#)). Ces agents semblent être la

meilleure option pour déterminer de façon définitive que la Lp(a) est un facteur de risque indépendant et causal des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques.

### - Hypercholestérolémie familiale et risque cardiovasculaire lié à la Lp(a)

L'hypercholestérolémie familiale est la deuxième cause d'origine génétique la plus fréquente de maladies cardiaques dans le monde derrière la Lp(a). Selon les dernières estimations, au moins une personne sur 250 est atteinte d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote et souffre d'une élévation anormale de cholestérol total et de LDL cholestérol dont les niveaux sont deux à trois fois plus élevés que chez les personnes normolipémiques (Akioyamen et al., 2017; Benn et al., 2016).

Outre les taux élevés de cholestérol total et de LDL cholestérol, des niveaux élevés en Lp(a) sont associés à une augmentation supplémentaire du risque d'événements cardiovasculaires chez ces patients. Une étude majeure, effectuée dans une cohorte de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, a clairement montré que les taux plasmatiques de Lp(a) étaient en moyenne plus élevés de 12% par rapport à des sujets sains, et prédisaient le risque de maladies cardiovasculaires indépendamment des niveaux de LDL cholestérol mais différemment selon le sexe (Figure 22) (Alonso et al., 2014).

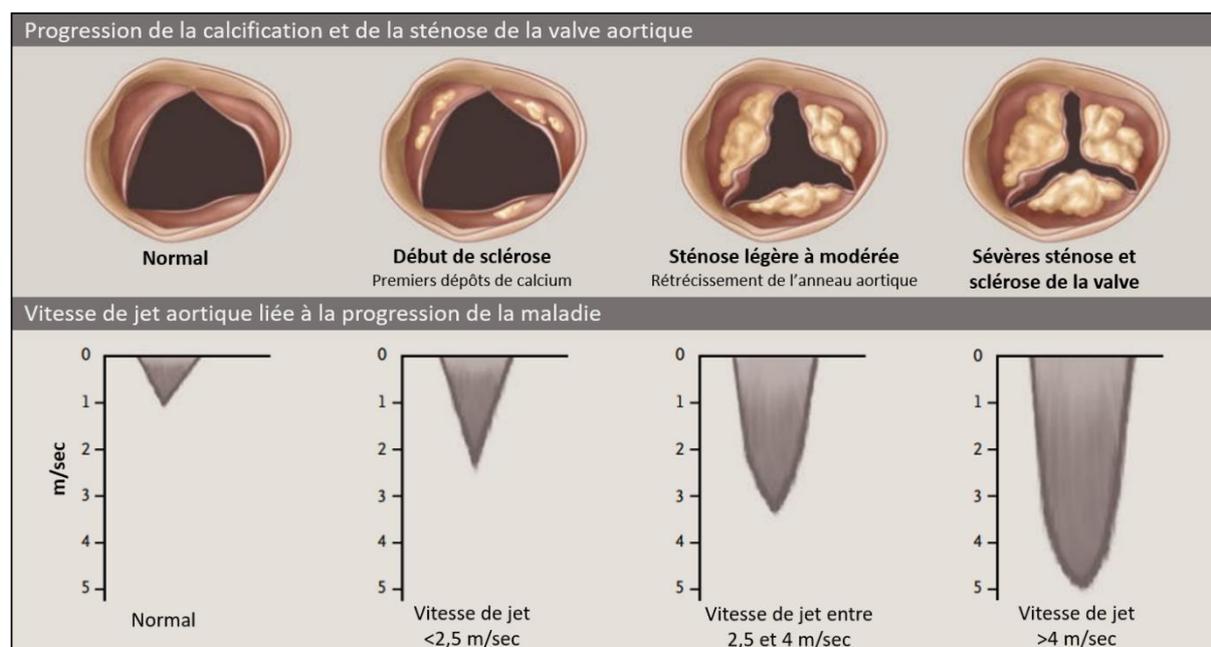


**Figure 22** – Taux de survie cardiovasculaire de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale en fonction des concentrations plasmatiques de Lp(a) et du sexe (extrait de Alonso et al., 2014). La ligne grise en pointillés indique les hommes avec une Lp(a) > 50 mg/dL, la ligne noire en pointillés indique les hommes avec des niveaux de Lp(a) < 50 mg/dL, la ligne continue grise indique les femmes avec une Lp(a) > 50 mg/dL, et la ligne continue noire indique les femmes avec une Lp(a) < 50 mg/dL.

Ainsi, même si le LDL cholestérol est suffisamment abaissé en utilisant les thérapies hypolipémiantes actuellement disponibles, un risque cardiovasculaire résiduel important demeure pour les personnes ayant une Lp(a) élevée (Willeit et al., 2018).

### 2.3.2. Sténose de la valve aortique

Le risque de maladies cardiovasculaires athérosclérotiques lié à des taux élevés de Lp(a) est de plus en plus reconnu par la communauté scientifique. Cependant, la Lp(a) est aussi un facteur de risque encore plus fort d'apparition et d'aggravation de la sténose de la valve aortique. La sténose aortique est définie comme un rétrécissement progressif de la valve aortique, également appelée valve tricuspide, par laquelle le sang est éjecté du ventricule gauche dans l'aorte (**Figure 23**). Cette pathologie affecte plus de 2,5 millions de personnes et entraîne une grave altération de la fonction cardiaque consistant en une insuffisance cardiaque, une angine de poitrine et une syncope lorsque la sténose devient sévère (Yutzey et al., 2014).



**Figure 23** – Stades de progression de la sténose de la valve aortique (traduit de Otto, 2008). Le dépôt progressif de calcium et le rétrécissement de l'anneau aortique entraînent une augmentation de la vitesse de jet aortique dont la mesure permet un diagnostic relativement précis de l'évolution de la maladie.

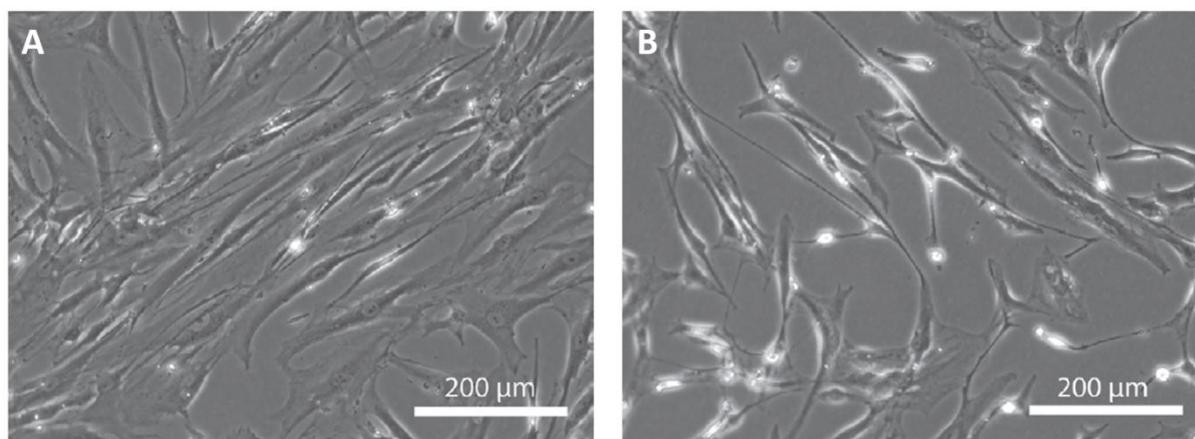
La progression naturelle de la sténose de la valve aortique consiste en une longue phase cliniquement silencieuse de calcification et de sclérose, qui dure généralement au moins dix ans, et qui est à l'origine de la maladie (Thanassoulis, 2016). Bien que le remplacement de la valve par endochirurgie offre une excellente option pour les patients à risque opératoire élevé

ou inopérables, la sténose de la valve constitue toujours un pronostic dégradé en raison de l'âge avancé, en général, et des comorbidités des patients.

La relation entre la Lp(a) et la sténose de la valve aortique a été mise en évidence en 1995 lors d'une étude observationnelle comparant l'apparition de la sténose aortique chez des patients avec des niveaux bas et élevés de Lp(a). Le groupe de sujets avec des taux de Lp(a) supérieurs à 30 mg/dL (~75 nmol/L) présentait trois fois plus de calcification au niveau de la valve aortique que le groupe avec des niveaux de Lp(a) inférieurs à 30 mg/dL (Gotoh et al., 1995). Ces observations ont été confirmées par l'étude de Stewart dans laquelle les patients avec une sténose de la valve présentaient des concentrations de Lp(a) 23% plus élevées que les sujets sains (Stewart et al., 1997). Pour la première fois en 1996, O'Brien a démontré par immunohistochimie la présence d'apoB100, d'apo(a) et d'apoE au niveau de dépôts lipidiques dans les lésions valvulaires (O'Brien et al., 1996). En 2013, une importante étude explorant la présence de calcifications de la valve aortique mesurées par imagerie CT-scan, a montré que les variations du gène *LPA*, associées à une augmentation des concentrations de Lp(a), favorisaient la calcification de la valve aortique dans plusieurs populations (Thanassoulis et al., 2013). Dans cette même étude, une approche par randomisation mendélienne a permis de mettre en évidence une relation causale entre les niveaux élevés de Lp(a) et la calcification de la valve aortique. Deux autres études prospectives sur 77 680 et 17 553 patients ont confirmé ces résultats. La première a montré une multiplication par trois du risque de sténose chez les individus avec des taux de Lp(a) supérieurs à 90 mg/dL par rapport aux individus avec moins de 5 mg/dL de Lp(a) (Kamstrup et al., 2014). La deuxième étude, analysant l'effet du SNP rs10455872 associé avec des taux élevés de Lp(a), a montré que les individus porteurs d'un ou deux allèles mutés avaient un risque de sténose aortique multiplié par 1,78 et par 4,83 respectivement, par rapport aux individus de génotype commun (Arsenault et al., 2014).

En 2015, Capoulade a démontré qu'en plus des concentrations plasmatiques de Lp(a) les niveaux de phospholipides oxydés présents sur l'apo(a) étaient associés à une progression rapide de la sténose aortique (Capoulade et al., 2015). Récemment, Zheng a confirmé ces données en combinant deux études prospectives et une étude *in vitro* réalisée sur des cellules interstitielles de valves saines obtenues après transplantation cardiaque. Les niveaux élevés de Lp(a) et de phospholipides oxydés liés à l'apo(a) étaient fortement associés à une augmentation de la calcification valvulaire et à une progression plus rapide de la maladie (Zheng et al., 2019). L'étude *in vitro* a permis de montrer un changement de morphologie des cellules interstitielles en présence d'apo(a) normale. Au contraire, aucun changement de morphologie n'a été observé

en présence d'apo(a) dépourvue du domaine KIV<sub>10</sub>, site de fixation des phospholipides oxydés sur l'apo(a) (**Figure 24**).



**Figure 24** – Effet de l'apo(a) sur la morphologie des cellules interstitielles des valves aortiques. Stimulation avec (A) de l'apo(a) normale ou (B) avec de l'apo(a) dépourvue du KIV<sub>10</sub> (extrait de Zheng et al., 2019). (A) : les cellules sont de forme rhomboïde. (B) : les cellules sont en forme de fuseau.

La découverte d'un rôle causal de la Lp(a) dans l'apparition et la progression des lésions athéromateuses et de la sténose aortique fournit des indices d'une grande importance sur la physiopathologie de la Lp(a), bien que le tableau clinique de ces deux maladies soit différent.

Lorsqu'on considère les points communs entre ces deux pathologies, la Lp(a) semble se comporter comme un facteur pouvant contribuer au dysfonctionnement endothélial, à l'apport de lipides, à la progression des lésions ainsi qu'à la favorisation de l'inflammation et des processus de calcification. Beaucoup de ces effets peuvent être attribués aux phospholipides oxydés associés à l'apo(a).

### 2.3.3. Mécanismes physiopathologiques

De nombreuses études suggèrent que la Lp(a) possède les mêmes propriétés que les LDL, en tant que facteur causatif du risque cardiovasculaire, bien qu'elle semble présenter des propriétés pro-athérogènes davantage prononcées. En effet, chez les individus à très haut risque cardiovasculaire en lien avec des concentrations très élevées de Lp(a) (> 200 mg/dL), le nombre équivalent de particules circulantes de Lp(a) (> 500 nmol/L) reste beaucoup plus faible que celui des particules de LDL d'individus normolipémiques (~1500 nmol/L). Cette différence en nombre de particules circulantes de Lp(a) et de LDL permet de constater le caractère extrêmement athérogène de la Lp(a) par rapport aux LDL. Cette extrême pathogénicité provient

donc essentiellement de la présence de l'apo(a). Cette dernière favorise l'apparition des maladies cardiovasculaires par des mécanismes additionnels aux LDL, en favorisant des réactions pro-inflammatoires en particulier par sa riche teneur en phospholipides oxydés et par la présence de sites de reconnaissances aux lysines qui entraînent l'accumulation préférentielle de la Lp(a) dans la paroi artérielle. L'apo(a) possède aussi des effets anti-fibrinolytiques et prothrombotiques potentiels en inhibant l'activation du plasminogène et en favorisant la réponse plaquettaire (Tsimikas, 2017). Malgré des recherches approfondies, les mécanismes exacts par lesquels la Lp(a), *via* l'apo(a), contribue à l'athérosclérose à la thrombose ou la calcification des valves aortiques ne sont toujours pas élucidés.

### **- Le cholestérol**

Alors que le risque de maladies cardiovasculaires a été stratifié précisément en fonction des niveaux de LDL cholestérol, aucune recommandation n'existe pour le cholestérol de la Lp(a) en raison de l'absence de données épidémiologiques pertinentes et de méthodes de dosage standardisées. En 2011, l'étude de Kinpara a montré que la masse totale de Lp(a) contenait en moyenne 30% de cholestérol, ce qui par conséquent induisait une surestimation du LDL cholestérol calculé par la formule de Friedewald (Kinpara et al., 2011). En conséquence, les auteurs ont suggéré de multiplier les concentrations massiques de Lp(a) en mg/dL par 0,3 afin d'estimer les niveaux de cholestérol de Lp(a) et de corriger les valeurs de LDL cholestérol calculées à partir de cette formule. Avec cette approche, Langsted, Kamstrup et Nordestgaard ont comparé le risque cardiovasculaire associé aux niveaux de cholestérol de Lp(a) avec les niveaux de LDL cholestérol corrigés. Sur la base d'une augmentation de 15 mg/dL (0,39 mmol/L) de LDL cholestérol ou de cholestérol de Lp(a), le risque de mortalité cardiovasculaire était significativement plus élevé pour la Lp(a) (+18%) que pour les LDL (+5%). Ces résultats suggèrent que la particule de Lp(a) confère un risque supérieur à celui expliqué uniquement par sa teneur en cholestérol (Langsted et al., 2019b, 2019c).

### **- L'importance des phospholipides oxydés dans la pathogénicité de la Lp(a)**

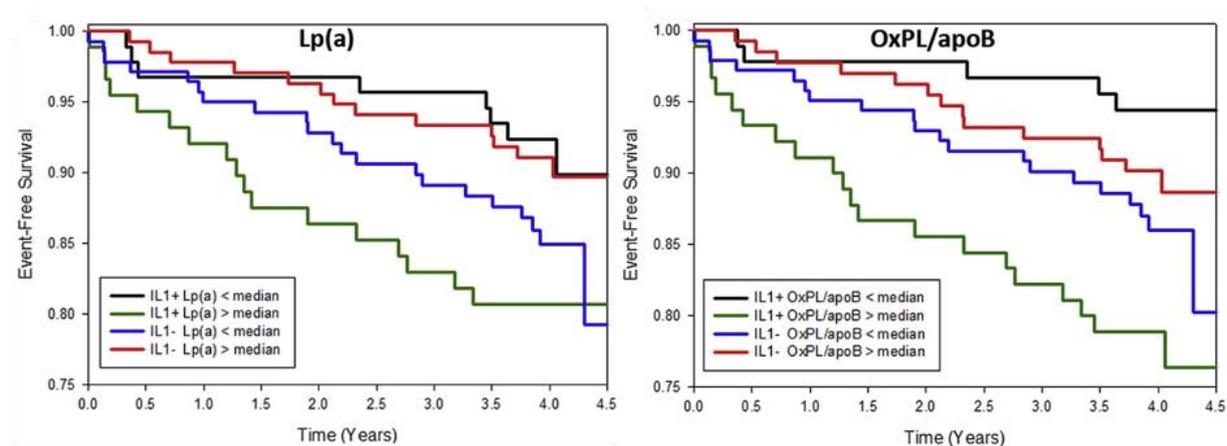
Les phospholipides oxydés sont associés aux lésions vasculaires par des récepteurs spécifiques des cellules immunitaires. Ils entraînent l'activation des voies de signalisation impliquées dans des processus pro-inflammatoires fragilisant les plaques d'athérome (Binder et al., 2016). Les travaux de Bergmark ont montré que chez un patient présentant des taux de Lp(a) de 112 mg/dL (~280 nmol/L), 85% des phospholipides oxydés des lipoprotéines à apoB100 détectés dans le plasma humain pouvaient être immunoprécipités avec un anticorps anti-apo(a). Cette

découverte indique que la Lp(a) est probablement le principal vecteur transportant les phospholipides oxydés dans le plasma, bien que le nombre de particules de Lp(a) soit beaucoup plus réduits que celui des LDL. Dans cette étude, Bergmark a également montré qu'environ la moitié des phospholipides oxydés de la Lp(a) se trouvait dans l'enveloppe phospholipidique de la lipoprotéine, l'autre moitié étant liée majoritairement à l'apo(a) (Bergmark et al., 2008). De récentes études ont montré que les niveaux de phospholipides oxydés des lipoprotéines à apoB100, c'est-à-dire en majorité de la Lp(a), étaient encore plus prédictifs du risque d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral, de sténose de la valve aortique et de mort cardiaque, que les niveaux de Lp(a) eux-mêmes (Capoulade et al., 2015; Tsimikas et al., 2010; Kiechl et al., 2007; Tsimikas et al., 2005).

### - Propriétés pro-inflammatoires

Plusieurs travaux ont suggéré que la Lp(a) pourrait stimuler la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales vasculaires, par les cellules musculaires lisses, ainsi que par les cellules de l'immunité dont les monocytes et les macrophages (Klezovitch et al., 2001; Ramharack et al., 1998). Aujourd'hui, de plus en plus de chercheurs pointent le rôle des phospholipides oxydés dans les mécanismes pro-inflammatoires de la Lp(a) (Boffa and Koschinsky, 2019).

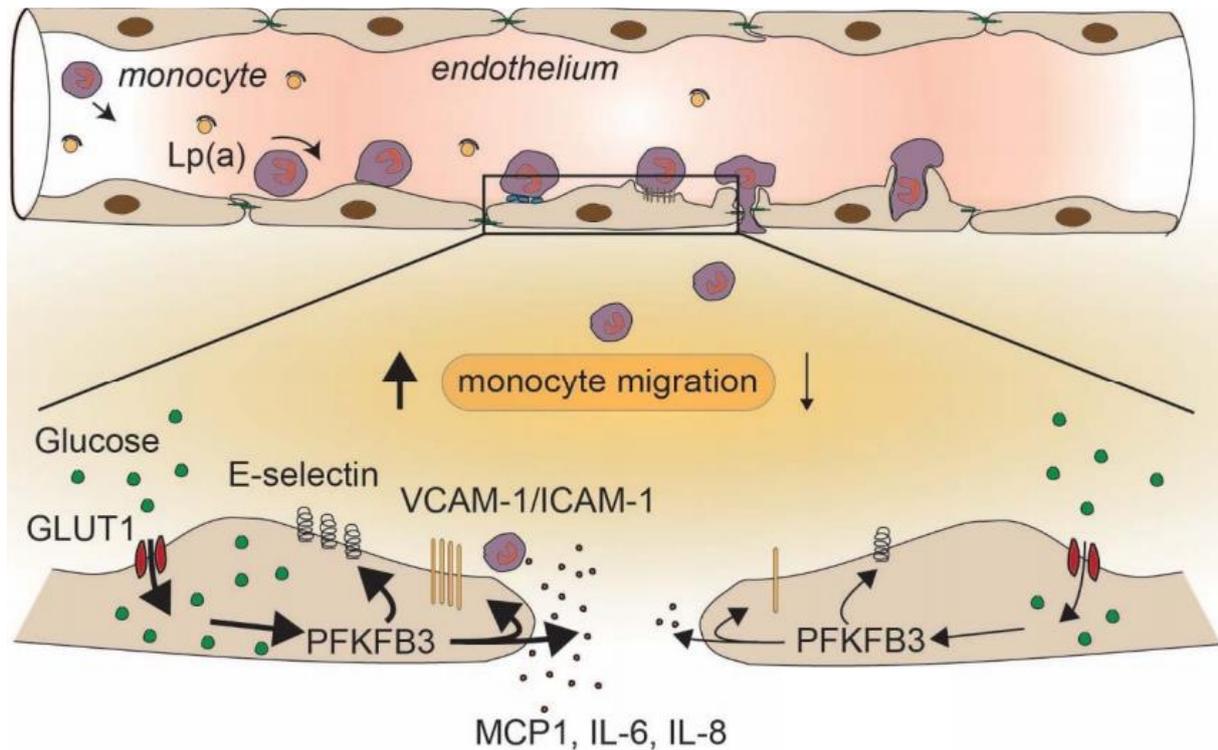
Des preuves importantes sur le rôle de la Lp(a) dans les processus inflammatoires ont été fournies par une étude chez des patients ayant subi une angiographie coronarienne. Cette étude a montré que des taux plasmatiques élevés en Lp(a) et en phospholipides oxydés étaient prédictifs de maladies coronariennes chez des patients présentant des variations génétiques sur l'interleukine 1 (*IL1*), connue pour être associée à une augmentation de la réponse pro-inflammatoire (Figure 25) (Tsimikas et al., 2014).



**Figure 25** – Taux de survie sans événement cardiovasculaire en fonction des taux de Lp(a) et de phospholipides oxydés, et de la présence d'une mutation du gène *IL1* (extrait de [Tsimikas et al., 2014](#)). *IL1+* : patients avec une mutation de la famille de gènes *IL1*. *IL1-* : patients sans mutation de la famille de gènes *IL-1*.

Ces données suggèrent un lien biologique et clinique entre les génotypes *IL1* pro-inflammatoires, l'oxydation des phospholipides, la Lp(a) et la prédisposition génétique au risque de maladies cardiovasculaires. Après la découverte par Tsimikas que les phospholipides oxydés pouvaient être associés à la Lp(a) ([Tsimikas et al., 2003](#)), des études ont démontré que les phospholipides oxydés fixés au niveau du KIV<sub>10</sub> ou du KV de l'apo(a) pouvaient stimuler la production d'IL-8 par les macrophages ([Edelstein et al., 2003](#)) mais que cet effet était abrogé lorsque la région de fixation des phospholipides oxydés sur l'apo(a) était mutée ([Scipione et al., 2015](#)). La phospholipase A2 est une enzyme libre ou associée aux lipoprotéines capable d'hydrolyser les phospholipides oxydés. Dans la même étude, Scipione a montré qu'en présence de phospholipase A2, la stimulation de la production d'IL-8 médiée par l'apo(a) dans les macrophages était également abolie suite à l'inactivation de la voie de signalisation impliquant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (« Nuclear Factor-Kappa B ») et les récepteurs TLRs (« Toll Like Receptors ») ([Scipione et al., 2015](#)). Dans les cellules endothéliales, l'apo(a) induit également la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine par la PKB (« Protein Kinase B ») entraînant une activation de l'expression de la cyclooxygénase 2 pro-inflammatoire ([Cho et al., 2013](#)). Une étude de 2016 a également rapporté que l'inflammation de la paroi artérielle était plus importante chez les individus avec une Lp(a) élevée (> 50 mg/dL) que chez les individus avec une Lp(a) normale (< 50 mg/dL). Les monocytes isolés des individus avec une Lp(a) élevée avaient des propriétés adhésives et migratrices plus importantes que les monocytes des individus avec des niveaux de Lp(a) normaux, résultant d'une augmentation de la sécrétion de TNF (« Tumoral Necrosis Factor ») et d'IL-6 ([van der Valk et al., 2016](#)).

Récemment, une étude a exploré l'impact de la Lp(a) et de ses phospholipides oxydés sur l'activation des cellules endothéliales artérielles. Les résultats montrent que la Lp(a) accélère la transmigration des monocytes à travers les cellules endothéliales et favorise la glycolyse médiée par la PFKFB (« 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase »), conduisant à un état pro-adhésif et pro-inflammatoire en augmentant l'expression d'interleukines de MCP-1 (« Monocyte Chemoattractant Protein 1 »), de VCAM-1, d'ICAM-1 et de sélectine E (**Figure 26**) (Schnitzler et al., 2020).



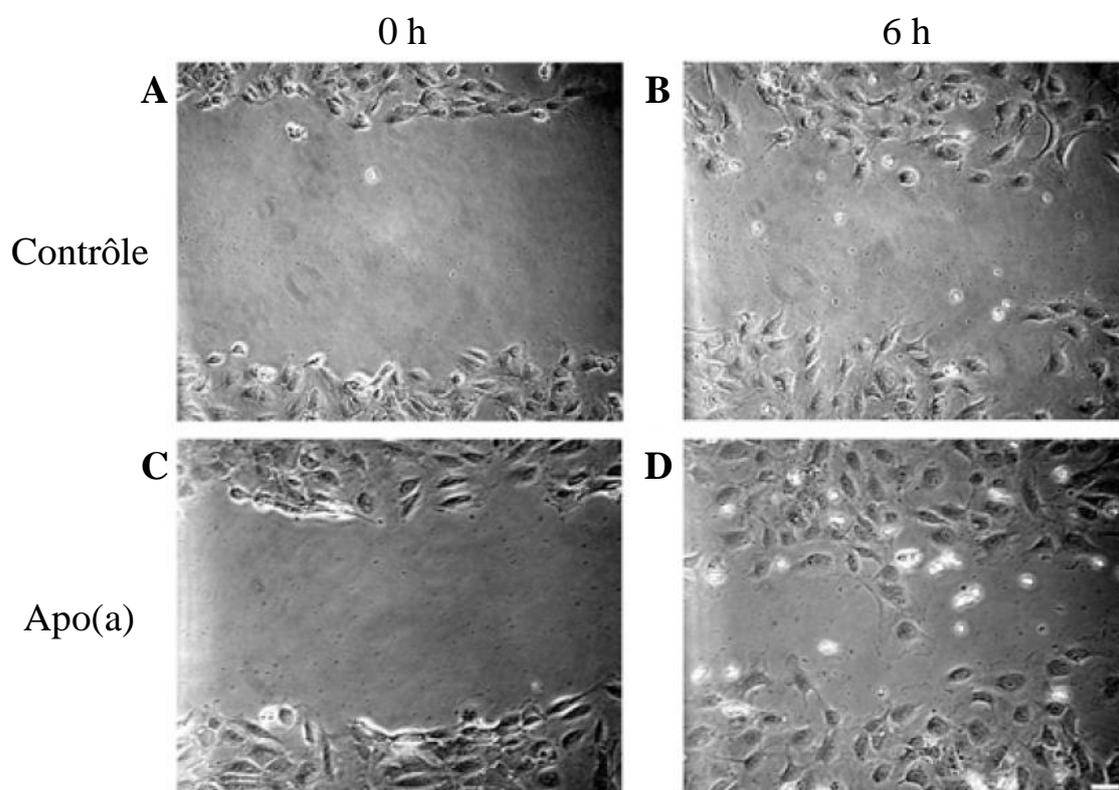
**Figure 26** – Mécanisme pro-inflammatoire potentiel de la Lp(a) et de ses phospholipides oxydés induisant l'augmentation de la migration monocytaire (extrait de Schnitzler et al., 2020)

### - Propriétés pro-athérogènes

Des études cinétiques *in vivo* ont montré que la Lp(a) radiomarquée pouvait pénétrer dans l'intima plus facilement que les LDL. Ces observations pourraient s'expliquer par un temps de résidence relativement long de la Lp(a) dans le plasma. En effet, l'apo(a) se fixerait plus facilement à l'intima ou aux caillots de fibrine au niveau des lésions de la paroi vasculaire *via* le site de reconnaissance aux lysines du KIV<sub>10</sub> (Nielsen et al., 1996, 1995). De plus, des travaux menés sur des souris transgéniques exprimant des variants de l'apo(a) humaine ont montré qu'une mutation du site au niveau du KIV<sub>10</sub> réduisait la formation de stries lipidiques dans les parois aortiques (Boonmark et al., 1997). Cependant, ces résultats ne permettent pas de savoir

si ces effets sont liés à la perte du site de fixation aux lysines ou à la perte du site d'accrochage des phospholipides oxydés sur l'apo(a). Deux récentes études du groupes de Pamir ont montré que la Lp(a) pouvait empêcher le plasminogène de favoriser l'efflux de cholestérol médié par ABCA1 (Tavori et al., 2019; Pamir et al., 2017). Les macrophages isolés des patients avec des concentrations de Lp(a) supérieures à 50 mg/dL (~125 nmol/L) présentaient un efflux de cholestérol environ 30% inférieur aux macrophages des patients avec des concentrations de Lp(a) inférieures à 50 mg/dL (~125 nmol/L) (Tavori et al., 2019).

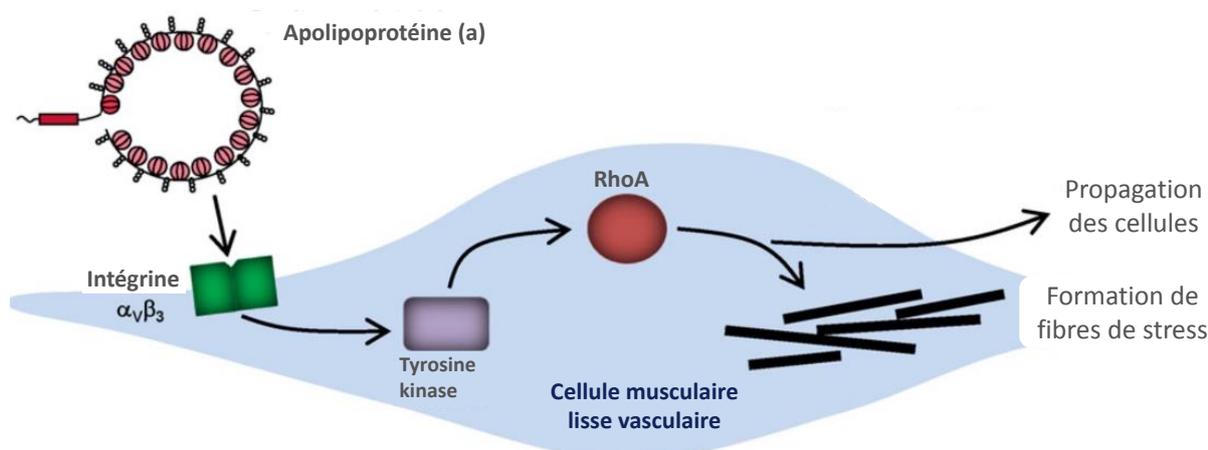
Le groupe de Koschinsky a identifié plusieurs voies de signalisation pro-athérogènes, activées par l'apo(a) suite à sa fixation *via* le KIV<sub>10</sub> à des récepteurs encore non identifiés de l'endothélium vasculaire. Parmi ces effets, l'apo(a) induirait le réarrangement du cytosquelette par la voie de signalisation de RhoK (« Rho-associated Protein Kinase ») entraînant une augmentation de la contraction et de la perméabilité des cellules endothéliales (Cho et al., 2008). L'apo(a) augmenterait également la migration (Figure 27), la prolifération et l'adhésion cellulaire par de voies de signalisation impliquant la phosphorylation des MAPKs (« Mitogen-Activated Protein Kinases ») et de la FAK (« Focal Adhesion Kinase ») (Liu et al., 2009).



**Figure 27** – Effet de l'apo(a) sur la migration cellulaire *in vitro* après une lésion. (A) 0 heure et (B) 6 heures après raclage en l'absence d'apo(a). (C) 0 heure et (D) 6 heures après raclage en présence d'apo(a). Echelle = 65  $\mu$ m. (extrait de Liu et al., 2009).

Une étude importante a également montré que les phospholipides oxydés de la Lp(a) pouvaient induire l'apoptose des macrophages de la plaque par un stress du réticulum endoplasmique ou *via* la synthèse accrue d'espèces réactives cytotoxiques de l'oxygène. Cet effet, probablement dépendant des récepteurs TLR2 et CD36, entraînerait la nécrose et la déstabilisation des plaques d'athérome, les rendant aussi plus sujettes à la rupture (Seimon et al., 2010).

L'une des principales caractéristiques d'une lésion athérosclérotique avancée est le remodelage anormal de la paroi vasculaire. Il implique notamment la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima, ainsi qu'un changement phénotypique de ces dernières perdant leur phénotype contractile pour un phénotype sécrétoire (matrice extracellulaire) en tant que cellules spumeuses, au même titre que les macrophages (Allahverdian et al., 2014). De nombreuses études ont montré que la Lp(a), *via* l'apo(a) et ses phospholipides oxydés, pourrait favoriser le changement phénotypique ainsi que la prolifération et la migration (**Figure 28**) des cellules musculaires lisses dans les lésions athérosclérotiques (Ichikawa et al., 2002; Riches et al., 2013).



**Figure 28** – Activation du mécanisme induisant la propagation des cellules musculaires lisses vasculaires par l'apo(a). L'apo(a) interagit avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à la surface des cellules. Cela active la voie de signalisation impliquant la tyrosine kinase qui phosphoryle RhoA pour l'activer et induire la formation de fibres de stress et la propagation cellulaire.

Les phospholipides oxydés augmenteraient également la production de MCP-1, d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ , entraînant ainsi une augmentation de l'état inflammatoire des cellules musculaires lisses en favorisant la production d'IL-6 et de métalloprotéinases (Alexander and Owens, 2012; Allen et al., 1998). Un autre mécanisme par lequel les phospholipides de la Lp(a) pourraient intervenir dans le changement phénotypique des cellules musculaires lisses implique la phosphorylation des enzymes ERK 1 et 2 (« Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2 »). Elles conduiraient à

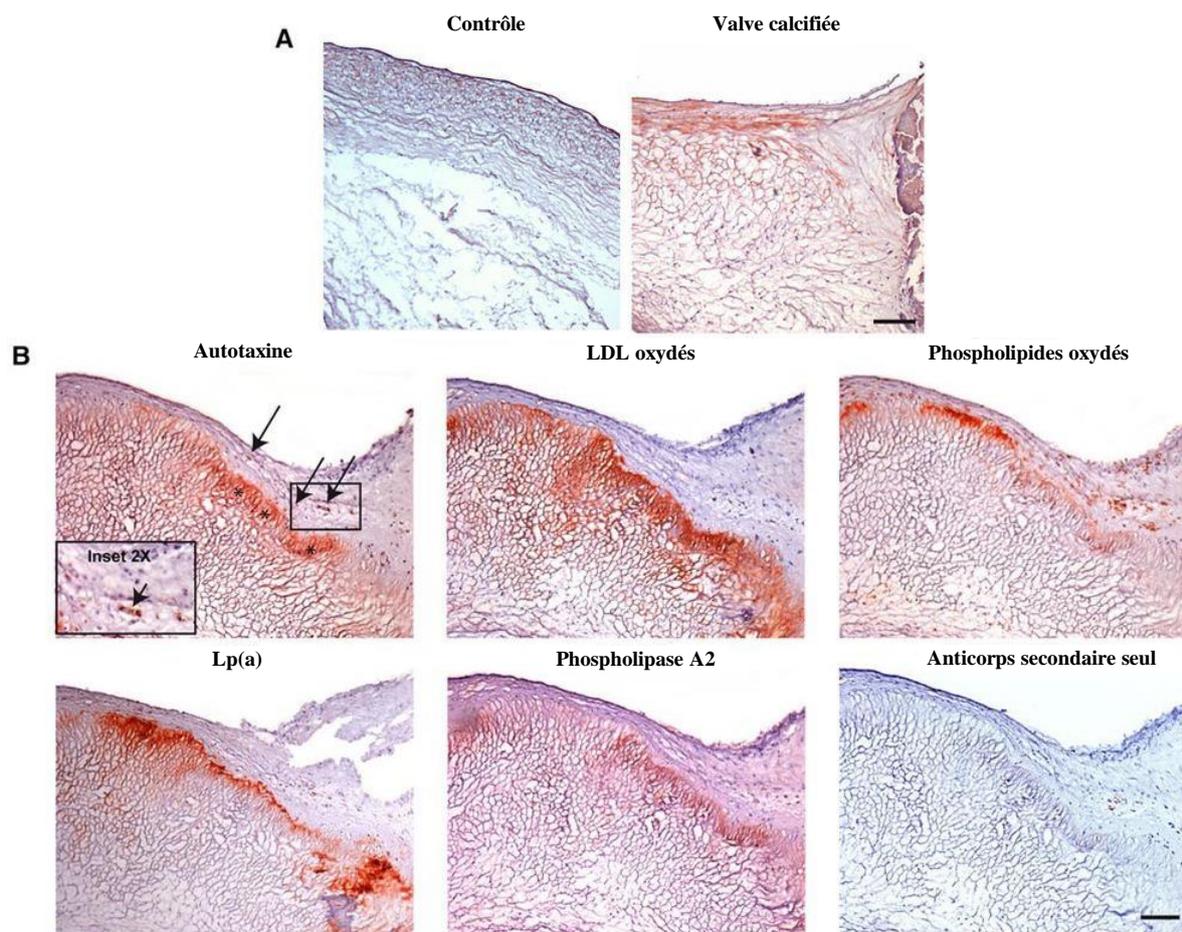
l'activation du facteur de transcription ETS, réprimant notamment l'expression de l' $\alpha$ -actine, marqueur spécifique des cellules musculaires lisses du phénotype contractile (Yoshida et al., 2008; Komai et al., 2002).

#### - Propriétés anti-fibrinolytiques et pro-thrombotiques

Deux études ont mis en évidence l'association entre la Lp(a) et la réponse plaquettaire mais leurs résultats sont contradictoires (Tsironis et al., 2004a; Rand et al., 1998). La première suggère que l'apo(a) pourrait augmenter la réponse plaquettaire *via* le récepteur à la thrombine PAR-1 (« Protease-Activated Receptor-1 ») (Rand et al., 1998), alors que la seconde étude suggère que la Lp(a) pourrait bloquer l'activation des plaquettes *via* le facteur PAF (« Platelet-Activating Factor ») de manière non spécifique (Tsironis et al., 2004a). Par ailleurs, une étude de Tsironis en 2004 a montré que la Lp(a) était enrichie en PAF-AH (« Platelet Activating Factor Acetylhydrolase »). L'activité de cette enzyme, capable d'hydrolyser et d'inactiver le facteur PAF et de dégrader les phospholipides pro-inflammatoires, serait diminuée en présence d'apo(a) (Tsironis et al., 2004b).

De nombreux rapports ont révélé que la Lp(a), à travers ses kringles, se fixe à la fibrine et empêche la liaison et l'activation du plasminogène en plasmine par le t-PA (Edelberg et al., 1990; Romagnuolo et al., 2018). La Lp(a) pourrait se fixer aux résidus lysines de la fibrine *via* les KIV<sub>5</sub> à KIV<sub>9</sub> et par conséquent interférer avec la fibrinolyse, puisque le domaine peptidase de l'apo(a) n'est pas actif (Hervio et al., 1995). Une autre étude a montré que la Lp(a) pourrait également s'associer à d'autres protéines prothrombotiques, dont l'alpha-2 macroglobuline, un inhibiteur de la plasmine, et SERPINA1 (« Serpin family A member 1 »), un inhibiteur du t-PA (von Zychlinski et al., 2011). Enfin, il semble que l'effet antifibrinolytique soit principalement dépendant de la taille des isoformes d'apo(a). Ainsi, plus les isoformes sont petites, plus l'effet antifibrinolytique semble élevé (Deb and Caplice, 2004).

**Sténose de la valve aortique** – Des données récentes ont également montré que, contrairement au cholestérol de la Lp(a) et des LDL, les phospholipides oxydés étaient à l'origine des effets pathogènes de la Lp(a) sur la calcification des valves aortiques (Bergmark et al., 2020). Une étude a montré que l'activité et les concentrations de l'enzyme autotaxine étaient plus élevées dans les valves aortiques minéralisées que dans les valves de témoins sains. De plus, l'autotaxine est colocalisée avec des LDL oxydés, les phospholipides oxydés et avec la Lp(a) dans les valves minéralisées (Figure 29) (Bouchareb et al., 2015).



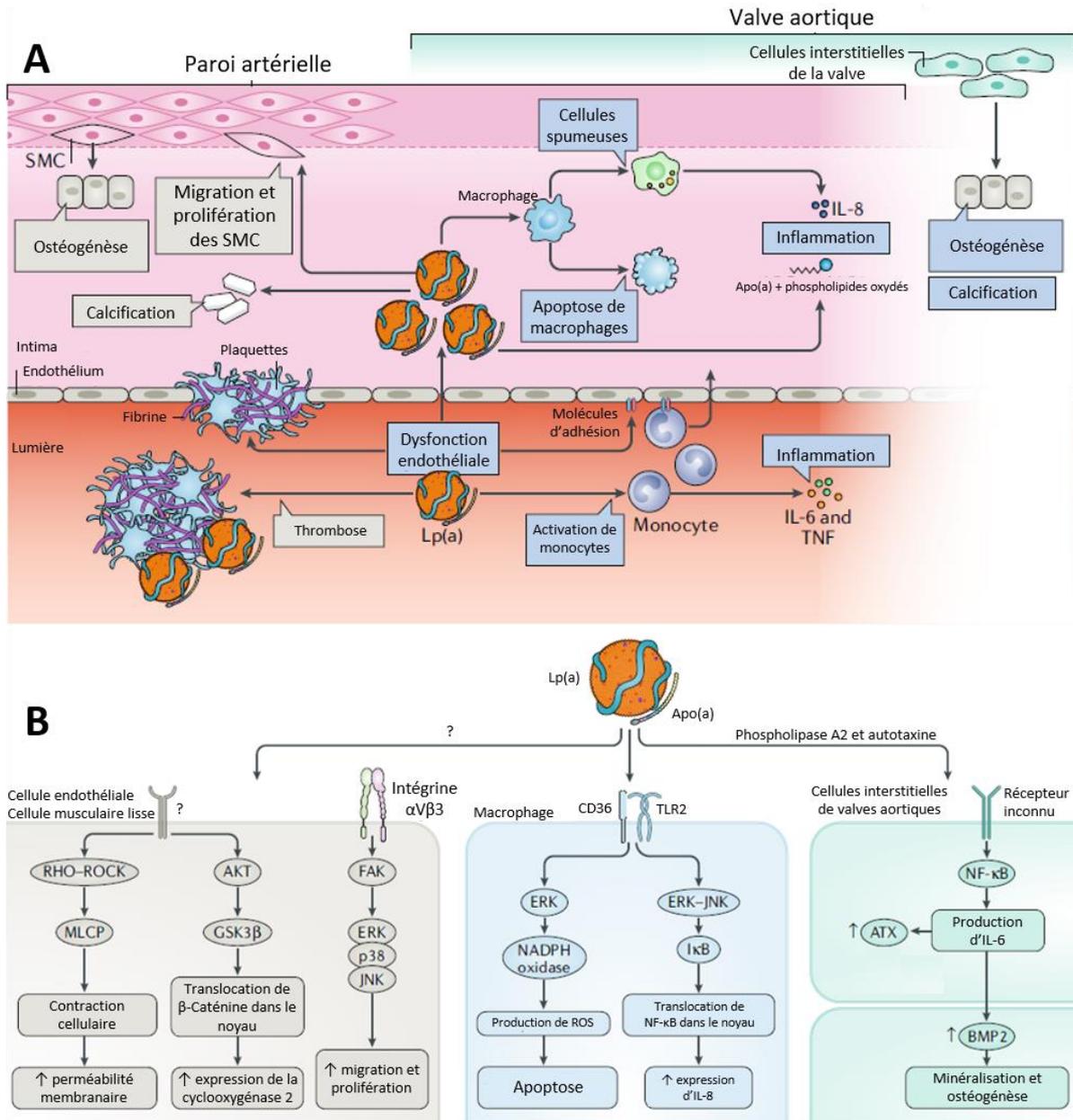
**Figure 29** – Coupes histologiques de valves saines et de valves calcifiées (traduit de [Bouchareb et al., 2015](#)). (A) Immunohistochimie de l'autotaxine dans les tissus non minéralisés de contrôles sains et de tissus calcifiés de valves aortiques. (B) Détection de l'autotaxine, des LDL oxydés, des phospholipides oxydés, de la Lp(a), de la phospholipase A2 dans des valves aortiques minéralisées. Echelle, 150  $\mu$ m.

L'autotaxine est également enrichie dans la fraction Lp(a) du plasma humain, ce qui suggère que la Lp(a) pourrait transporter l'autotaxine vers la lésion valvulaire aortique ([Bouchareb et al., 2015](#)). L'autotaxine contribuerait à la formation d'acide lysophosphatidique à partir de l'hydrolyse des phospholipides oxydés de la Lp(a) par la phospholipase A2. L'acide lysophosphatidique favoriserait la minéralisation des valves par l'activation de NF- $\kappa$ B, ce qui conduirait à la production d'IL-6 et à l'augmentation de l'expression de BMP2 (« Bone Morphogenetic Protein 2 »), un médiateur majeur de l'ostéogénèse dans les cellules interstitielles des valves ([Bouchareb et al., 2015](#)). L'activation de la signalisation NF- $\kappa$ B entraînerait aussi une augmentation de la production d'autotaxine *in situ*. Une preuve importante de l'importance des phospholipides oxydés et de l'autotaxine de la Lp(a) dans le risque de sténose aortique vient d'une étude clinique dans laquelle des patients atteints de sténose valvulaire aortique ont été comparés avec des patients atteints de maladies coronariennes. Les

niveaux plasmatiques d'autotaxine étaient indépendamment associés à la sténose de la valve. Cette association était amplifiée chez les individus avec des niveaux élevés en Lp(a) ou en phospholipides oxydés (Nsaibia et al., 2016). En revanche, une autre étude utilisant des cellules interstitielles isolées de valves aortiques humaines non calcifiées a suggéré des effets indépendants des phospholipides de la Lp(a). L'incubation avec de la Lp(a) purifiée entraînait une augmentation de voies impliquées dans l'ostéogénèse, y compris une prolifération accrue des cellules interstitielles, une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et une libération de phosphate (Yu et al., 2017). Au niveau moléculaire, la Lp(a) semble induire la phosphorylation de plusieurs kinases dont p38 MAPK et GSK3 $\beta$  (« Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$  »), la contraction cellulaire et la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau (Yu et al., 2017). Par ailleurs, ces effets seraient dépendants du site de reconnaissance aux lysines situé au niveau du KIV<sub>10</sub> de l'apo(a) (Liu et al., 2009). Une étude récente de Capoulade, publiée en 2020, a suggéré que des niveaux élevés d'apoC-III liée à la Lp(a) pourraient aussi être prédictifs d'une sténose légère à modérée, de la progression rapide de la maladie et de décès cardiaques (Capoulade et al., 2020). Cependant, les mécanismes sous-jacents restent connus. Les mécanismes et les voies métaboliques les mieux décrits dans la physiopathologie de la Lp(a) sont résumés dans la **Figure 30**.

De plus en plus de spécialistes suggèrent que la haute teneur en phospholipides oxydés de la Lp(a) est la principale cause de son extrême pathogénicité. Néanmoins, de nombreuses questions restent sans réponse sur l'origine de l'oxydation de ces phospholipides. La manière dont cette oxydation affecte la pathogénicité de la Lp(a) n'a pas non plus été explorée. On ignore également la proportion de particules de Lp(a) contenant des phospholipides oxydés fixés au niveau du KIV<sub>10</sub> de l'apo(a). Aucune étude n'a exploré l'effet de la taille de l'apo(a) sur les caractéristiques biochimiques et la composition de la Lp(a), notamment en phospholipides oxydés. De plus, la recherche *in vivo* sur la Lp(a) est confrontée au manque de modèles animaux exprimant l'apo(a) ce qui réduit les possibilités d'études et ralentit la recherche fondamentale et translationnelle sur la Lp(a).

La recherche clinique manque également de données face au risque cardiovasculaire lié à la Lp(a). Alors que le risque cardiovasculaire lié aux niveaux de LDL cholestérol est bien maîtrisé grâce aux statines et aux nouveaux hypolipémiants que sont les inhibiteurs de PCSK9, les thérapies à disposition des cliniciens pour traiter les patients atteints d'hyper-Lp(a) manquent toujours.



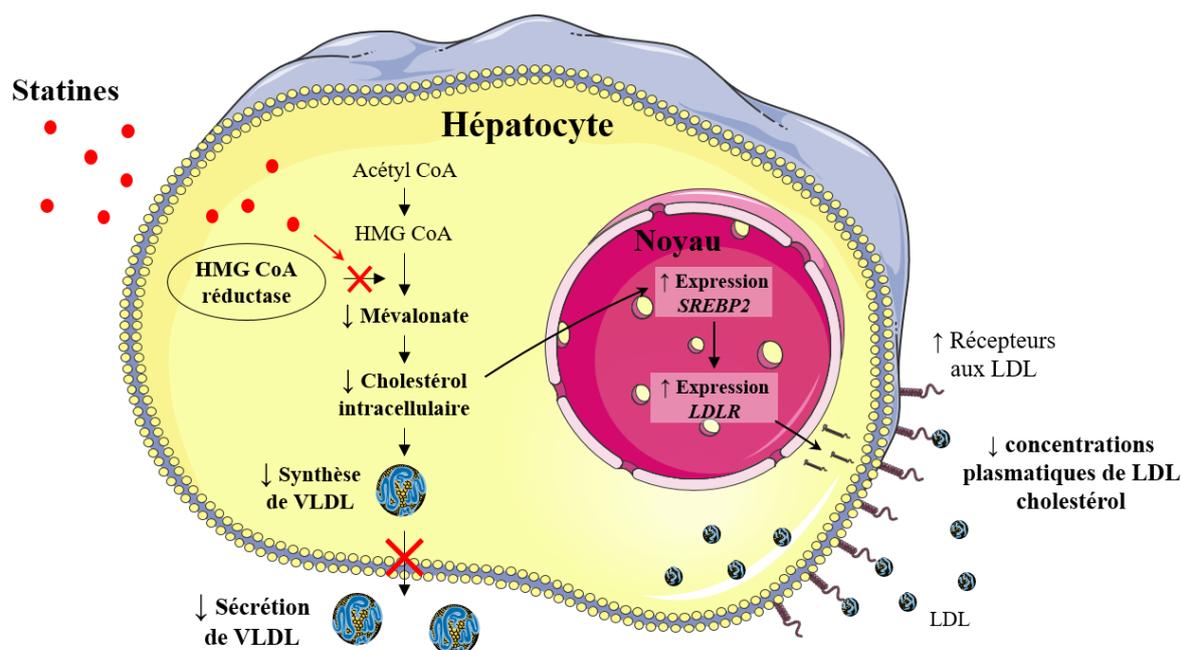
**Figure 30** – (A) Mécanismes pathogènes de la Lp(a). (B) Voies métaboliques principales impliquées dans les mécanismes pathogènes de la Lp(a). SMC : Cellules musculaires lisses, ATX : Autotaxine. (traduit de *Boffa and Koschinsky, 2019*).

### 3. Interventions thérapeutiques et réduction de la Lp(a)

Beaucoup d'études de cohortes explorant l'effet de différents hypolipémiants, tels que les statines et les inhibiteurs de PCSK9, ont décrit une efficacité modérée et hétérogène sur les taux de Lp(a). Face à l'incapacité des cliniciens à traiter les patients hyper-Lp(a) autrement que par aphaérese, les premiers essais cliniques de thérapies ciblant spécifiquement la Lp(a) commencent à se mettre en place.

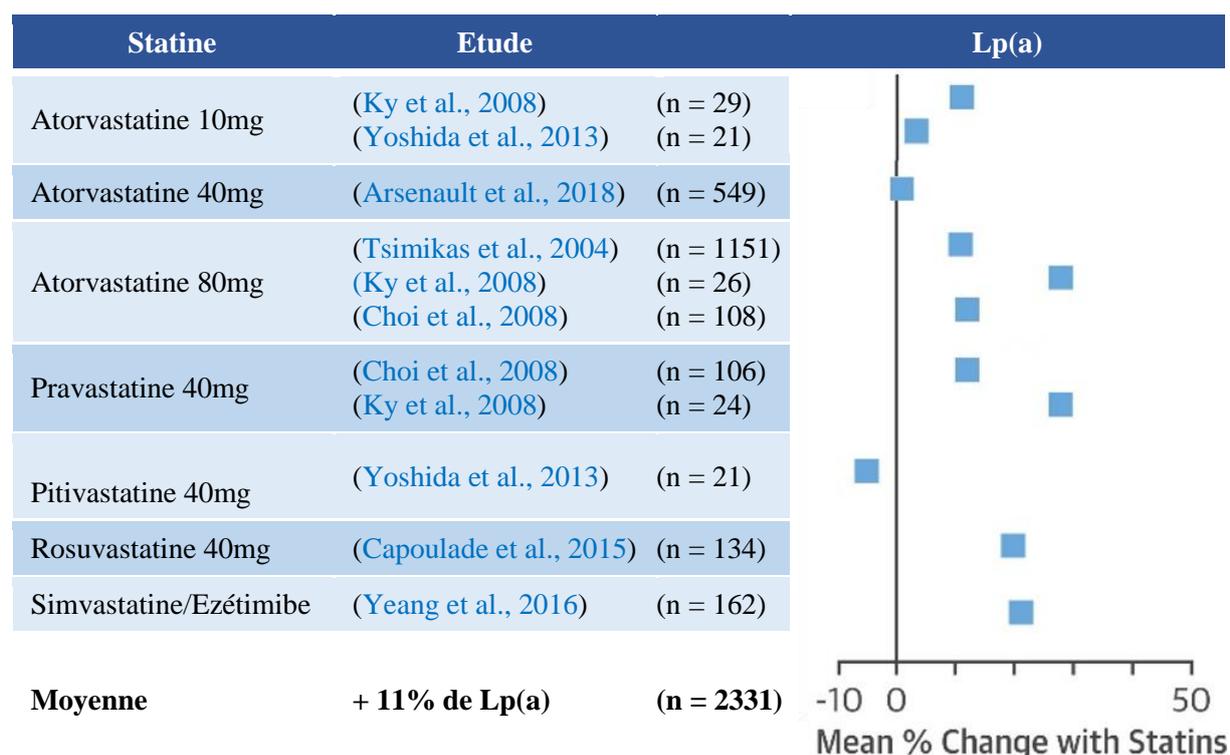
#### 3.1. Les statines

Les statines sont les hypolipémiants les plus prescrits au monde pour réduire les taux de LDL cholestérol et le risque de maladies cardiovasculaires associé (Mach et al., 2020). Elles agissent en bloquant de manière compétitive le site actif de la première enzyme clé de la voie du mévalonate, la HMG-CoA (« Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A ») réductase. L'inhibition de ce site empêche l'accès au substrat, bloquant ainsi la conversion de HMG-CoA en acide mévalonique. Cela se traduit par une diminution de la synthèse de cholestérol hépatique ainsi que de la production et de la sécrétion de VLDL. La réduction de la concentrations de cholestérol intracellulaire entraîne l'activation de SREBP2 (« Sterol Response Element Binding Protein 2 »), un facteur de transcription activant notamment l'expression du gène *LDLR*, favorisant l'expression du LDLR à la surface des hépatocytes, afin de permettre aux cellules de maintenir leurs concentrations intracellulaires en cholestérol. Ainsi, une absorption accrue de LDL et des autres lipoprotéines à apoB100 a lieu au niveau du foie, diminuant les taux de cholestérol plasmatique de 20 à 55% et le risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire associé (Figure 31) (Ward et al., 2019). Il existe plusieurs classes de statines qui se distinguent par leurs modalités de synthèse, leur polarité, leur formule chimique, et surtout leur efficacité sur la réduction des niveaux de LDL cholestérol. Parmi les plus prescrites, la rosuvastatine, l'atorvastatine et la simvastatine sont les plus puissantes alors que la lovastatine, la pravastatine et la fluvastatine dites de première génération, entraînent une réduction des concentrations de LDL cholestérol plus modérée (Stein, 2003).



**Figure 31** – Schéma des mécanismes cellulaires principaux à l'origine des effets hypolipémifiants des statines.

Les premières données concernant l'effet des statines sur la Lp(a) proviennent de l'étude de Kostner en 1989 montrant une augmentation moyenne de Lp(a) de 33% avec une dose de 30 mg/jour de lovastatine (Kostner et al., 1989). Plus récemment, l'essai clinique randomisé JUPITER a montré que la rosuvastatine diminuait considérablement les niveaux de LDL cholestérol mais n'avait aucun effet sur les niveaux de Lp(a). Par conséquent, les patients traités présentant des concentrations élevées de Lp(a) avaient un risque résiduel significatif de complications cardiovasculaires (Khera et al., 2014). Cette observation a été rapportée dans les études investiguant l'effet d'autres statines avec ou sans ezetimibe, sur les niveaux de Lp(a) (Figure 32) (Tsimikas, 2017). L'ezetimibe en monothérapie semble toutefois légèrement réduire la Lp(a), d'après la méta-analyse de Awad publiée en 2018 (Awad et al., 2018).



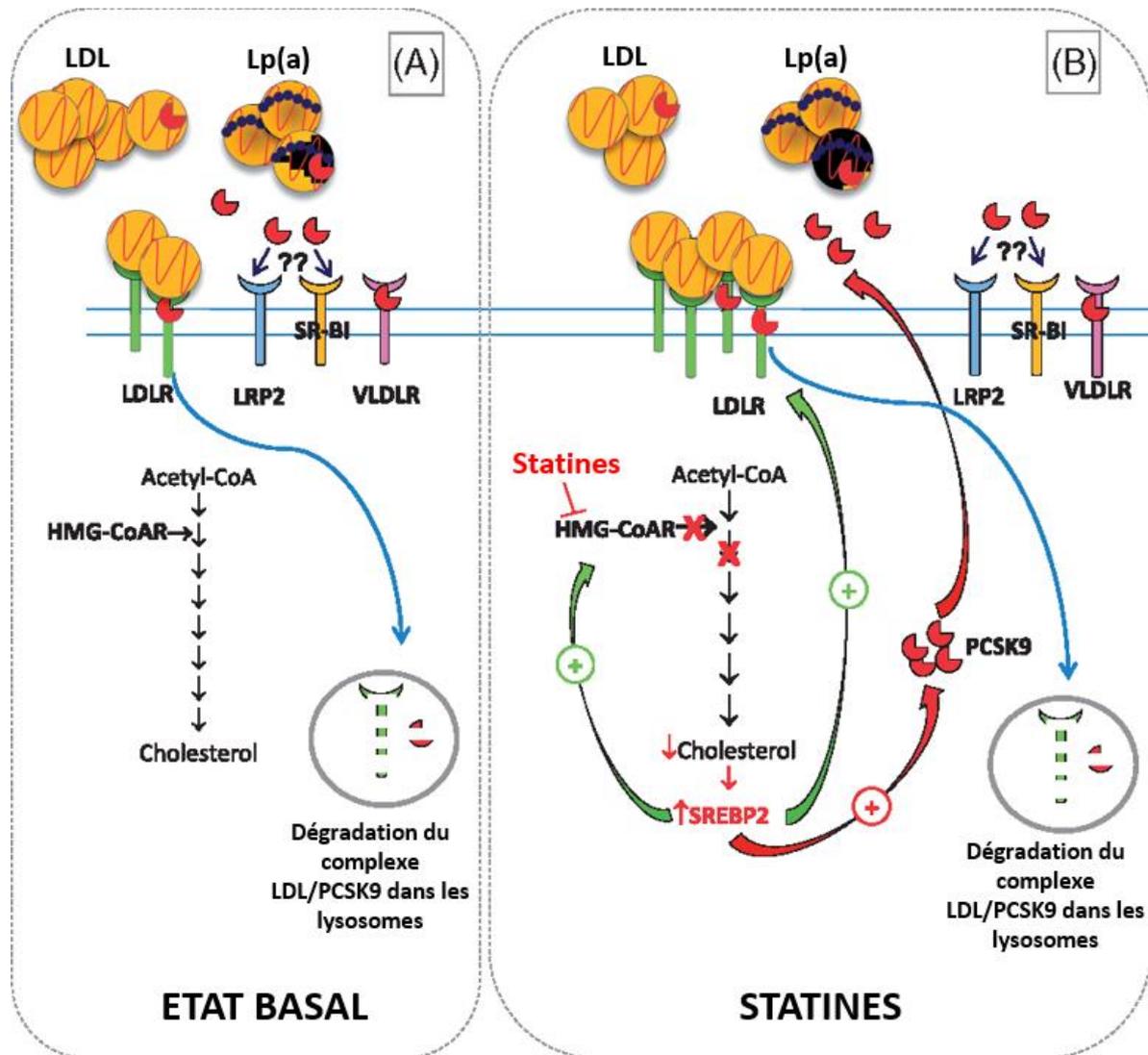
**Figure 32** – Effet de différentes statines avec ou sans ezetimibe sur les taux de Lp(a) (modifié de Tsimikas, 2017).

Dans une étude majeure de Willeit, l'utilisation de statines a montré une réduction des concentrations de LDL cholestérol de 39% sans modification significative des niveaux de Lp(a), augmentant ainsi le rapport Lp(a)/LDL cholestérol. Le risque cardiovasculaire estimé associé à la Lp(a) était augmenté de 12% pour les patients présentant des taux de Lp(a) supérieurs à 50 mg/dL (~125 nmol/L) (Willeit et al., 2018). Par ailleurs, une récente méta-analyse indique que les statines (atorvastatine, pravastatine, rosuvastatine et pitavastatine) augmentent légèrement mais significativement les concentrations plasmatiques de Lp(a). Dans cette étude, les statines augmentaient l'expression du gène *LPA* de 50% dans des cellules HepG2 (Tsimikas et al., 2019). En 2018, une étude autre majeure a comparé les cinétiques d'apo(a) avant et après traitement par atorvastatine chez 17 patients avec des niveaux moyens de Lp(a) de 15 nmol/L. Aucun effet n'a été observé sur les niveaux de Lp(a) ni sur la cinétique d'apo(a), malgré une augmentation non significative de 20% de la vitesse de catabolisme et de 4% de la vitesse de production (Watts et al., 2018).

Les raisons pour lesquelles les statines n'ont pas d'effets ou augmentent même parfois les niveaux de Lp(a) sont controversées. Comme les statines augmentent considérablement l'expression du LDLR à la surface des hépatocytes, l'absence d'effet sur la Lp(a) semble indiquer que ce récepteur n'est pas ou très peu responsable de sa clairance hépatique.

Des études cinétiques comparant les vitesses de production et de catabolisme avant et après traitement aux statines de patients présentant des taux élevés de Lp(a) permettraient de clarifier le débat. D'autre part, les statines augmentent aussi fortement l'expression de HNF-1 $\alpha$  (Dong et al., 1996), un facteur de transcription majeur du gène *LPA* (Wade et al., 1994), ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la Lp(a) par les statines (Tsimikas et al., 2019).

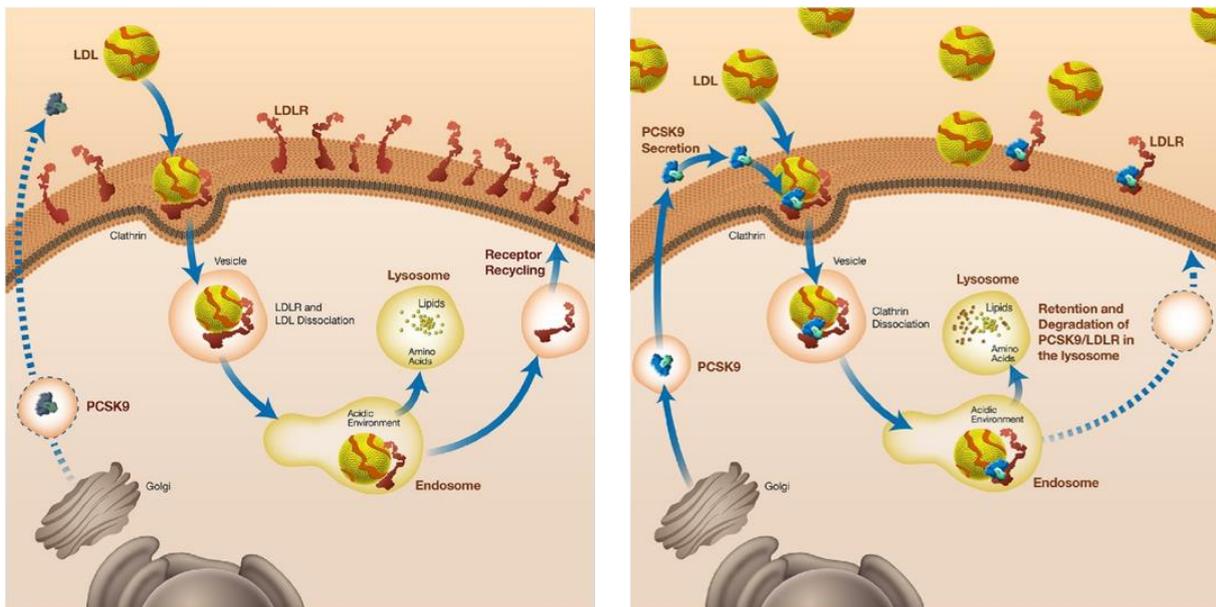
Les statines induisent également l'activation de SREBP2 (« Sterol Response Element Binding Protein 2 »), un facteur de transcription activant *PCSK9*, ce qui provoque une élévation des niveaux plasmatiques de PCSK9 (Dong et al., 1996). PCSK9 pourrait induire une augmentation de la production de Lp(a) comme cela est suggéré dans les hépatocytes primaires et chez le singe *in vivo* (Croyal et al., 2018; Villard et al., 2016). L'hypothèse d'un mécanisme impliquant PCSK9 dans la synthèse intracellulaire de Lp(a) n'est donc pas exclue. D'autres chercheurs suggèrent que l'augmentation de PCSK9 par les statines pourrait diminuer l'expression du LDLR au niveau du foie et ainsi empêcher l'internalisation de la Lp(a) *via* ce récepteur (**Figure 33**) (Pirillo and Catapano, 2018). Cette éventualité est renforcée par le fait que l'inhibition de PCSK9 par des anticorps monoclonaux entraîne une diminution de la Lp(a) (Stein et al., 2012).



**Figure 33** – Mécanisme potentiel des statines sur la Lp(a). (A) En condition normale, l'expression du LDLR est régulée par la teneur en cholestérol intracellulaire et la quantité de PCSK9 extracellulaire. (B) Les statines réduisent la biosynthèse du cholestérol et augmentent l'expression du LDLR permettant un effet synergique dans la réduction des taux de LDL-C. Cependant l'augmentation de l'expression de PCSK9 par les statines empêche le LDLR d'être trop fortement exprimé à la surface des hépatocytes. Dans ces conditions, le LDLR n'est pas disponible pour fixer la Lp(a) car il est principalement engagé dans l'élimination des LDL pour lesquels son affinité est plus élevée. Il n'est pas exclu que d'autres récepteurs éventuellement impliqués dans l'absorption de la Lp(a) pourraient être contrôlés par PCSK9. De plus, des niveaux très élevés de PCSK9 pourraient entraîner la formation de complexes PCSK9-Lp(a) ou PCSK9-LDL qui pourraient également moduler leur clairance (traduit de [Pirillo and Catapano, 2018](#)).

### 3.2. Les inhibiteurs de PCSK9

PCSK9 joue un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines en inhibant le LDLR. PCSK9 se lie au domaine EGF-A (« Epidermal Growth Factor precursors homology domain A ») de la partie extracellulaire du LDLR et subit une endocytose avec ce dernier. L'affinité entre le récepteur et PCSK9 augmente au pH acide de l'endosome et empêche le changement de conformation nécessaire à son recyclage membranaire. Le complexe PCSK9/LDLR est ensuite dégradé dans le lysosome, empêchant le recyclage normal du LDLR et son retour vers la membrane plasmique (**Figure 34**) (Ramin-Mangata et al., 2018).



**Figure 34** – Effet de PCSK9 sur l'expression du LDLR à la surface des cellules. À gauche : recyclage du récepteur en l'absence de PCSK9. À droite : inhibition du recyclage du récepteur en présence de PCSK9 (extrait de Ramin-Mangata et al., 2018).

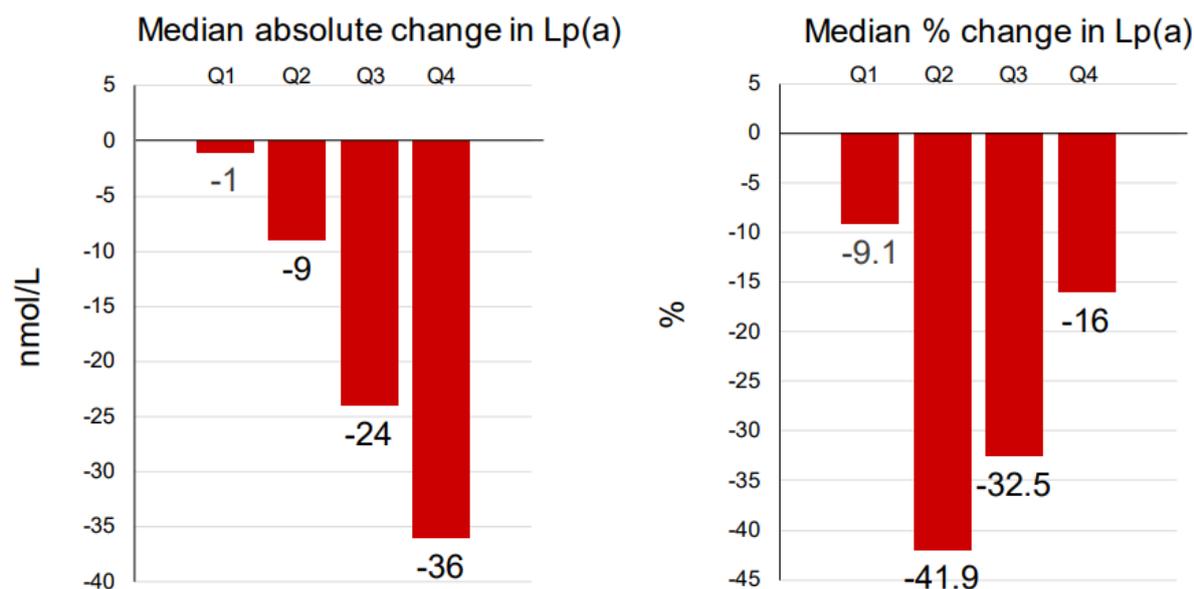
Les mutations GOF de PCSK9 représentent la troisième cause d'hypercholestérolémie familiale (Abifadel et al., 2003; Seidah et al., 2003). À l'inverse, les mutations LOF de PCSK9 sont associées à des taux de LDL cholestérol très bas ainsi qu'à une protection cardiovasculaire accrue, sans toutefois engendrer d'effets secondaires délétères (Cohen et al., 2006, 2005). Ces découvertes sont à l'origine du développement d'une nouvelle classe d'hypocholestérolémiants, les inhibiteurs de PCSK9.

### 3.2.1. Les anticorps monoclonaux anti-PCSK9

Deux anticorps monoclonaux humains anti-PCSK9 (alirocumab et evolocumab) sont actuellement approuvés pour la réduction du LDL cholestérol et la prévention cardiovasculaire. Les anticorps anti-PCSK9 abaissent le LDL cholestérol en augmentant le nombre de LDLR à la surface des cellules. Les inhibiteurs de PCSK9 sont généralement prescrits aux patients à très haut risque cardiovasculaire, comme c'est le cas pour l'hypercholestérolémie familiale, et dont les concentrations de LDL cholestérol n'ont pas atteint des taux inférieurs à 70 mg/dL malgré un traitement combiné de statines à la dose maximale autorisée ou tolérée et d'ezetimibe (Mach et al., 2020).

Contrairement aux statines, les inhibiteurs de PCSK9 diminuent les taux plasmatiques de Lp(a). En 2012, deux études ont montré que l'inhibiteur de PCSK9 développé par SANOFI-REGENERON (alirocumab), pouvait diminuer la Lp(a) de manière significative et dose-dépendante chez des sujets sains, chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale ou acquise, et chez des patients avec des taux de LDL cholestérol inférieurs à 100 mg/dL (McKenney et al., 2012; Stein et al., 2012). Contrairement à la réduction relativement homogène des niveaux de LDL cholestérol comprise en 50 et 70%, la réduction des concentrations de Lp(a) variait entre 10% et 45% pour les doses maximales d'alirocumab (150 mg toutes les deux semaines). En 2013, des résultats similaires ont été observés pour l'anticorps d'AMGEN (evolocumab). Les patients hypercholestérolémiques familiaux traités par injection de 140 mg d'evolocumab toutes les deux semaines, présentaient une réduction de Lp(a) de 37% en moyenne. Par ailleurs, la réduction de la Lp(a) était significativement corrélée à la réduction de LDL cholestérol ( $r = 0.33$ ,  $p < 0.001$ ), faisant émerger à nouveau l'hypothèse d'un rôle du LDLR dans l'épuration de la Lp(a) en notant toutefois une forte discordance d'efficacité entre la réduction de LDL cholestérol et celle de la Lp(a) (Desai et al., 2013). Les mêmes observations ont été faites en 2016 sur une cohorte de 3 278 patients traités par l'evolocumab (Raal et al., 2016). Une étude récente a exploré la discordance entre l'abaissement du LDL cholestérol et celui de la Lp(a) induite par l'evolocumab dans une cohorte de 895 patients (Shapiro et al., 2019). Pour évaluer cette discordance, les auteurs ont comptabilisé le nombre de patients avec une réponse discordante, c'est-à-dire ceux pour lesquels la réduction du LDL cholestérol était supérieure à 35% et la réduction de la Lp(a) inférieure à 10%, et pour lesquels la réduction du LDL cholestérol était inférieure à 35% et la réduction de la Lp(a) supérieure à 10%. Parmi les 19,7% de patients présentant une réponse discordante, beaucoup présentaient une réduction du LDL cholestérol supérieure à 35% mais une réduction de la Lp(a) inférieure à 10%. Par ailleurs,

la fréquence de ce profil de patients était beaucoup plus importante pour ceux avec une Lp(a) élevée à l'inclusion (Shapiro et al., 2019). Cette discordance, évaluée sur les mêmes critères, a été confirmée avec l'alirocumab par la même équipe, avec 21,5% de patients présentant une réponse discordante au traitement (Mahmood et al., 2020). Plus les taux de Lp(a) avant traitement par l'evolocumab ou l'alirocumab sont élevés, plus la réduction de la Lp(a) en valeur absolue est élevée alors que la réduction relative (en pourcentage) est quant à elle, plus faible (Figure 35) (O'Donoghue et al., 2019; Gaudet et al., 2014; Desai et al., 2013).



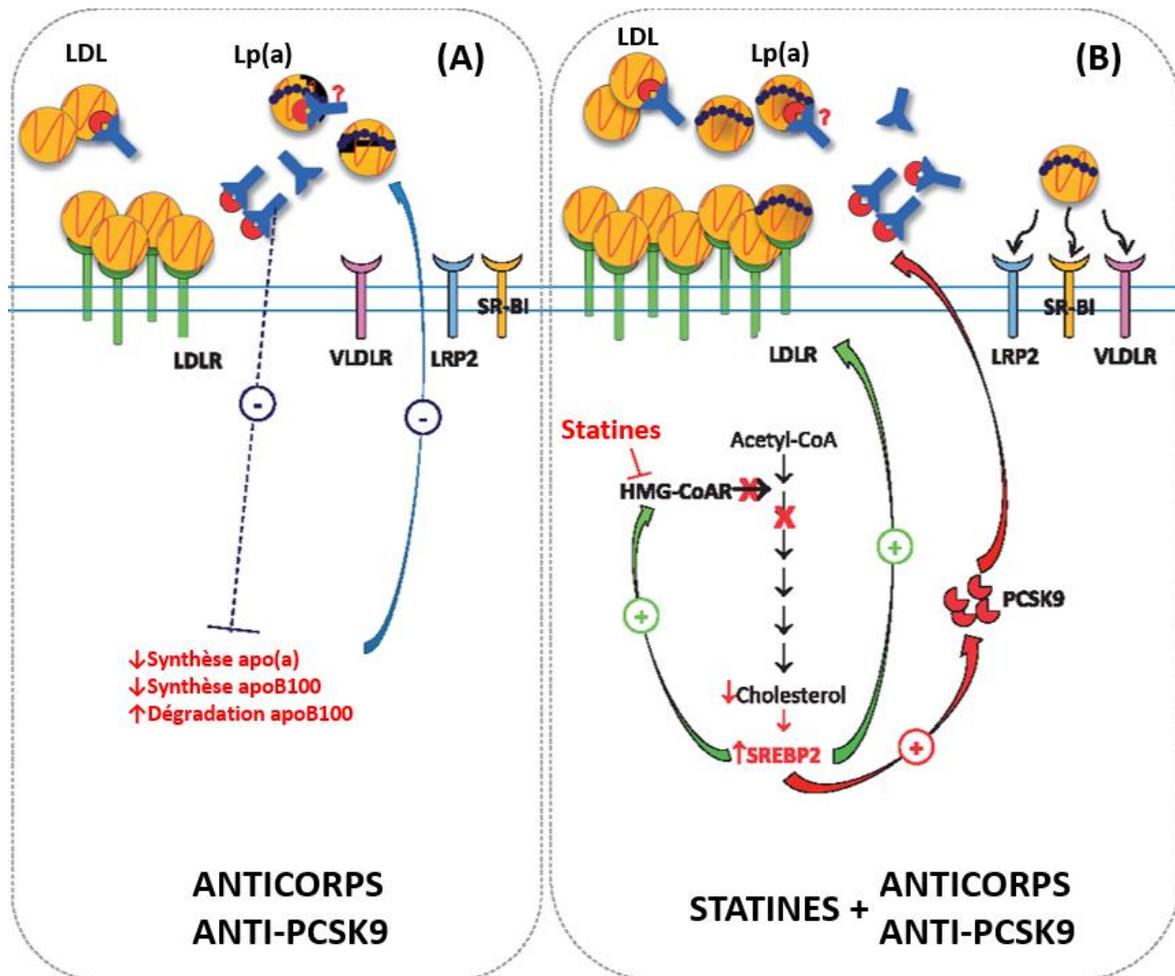
**Figure 35** – Réduction absolue et relative de la Lp(a) par les inhibiteurs de PCSK9 (extrait de O'Donoghue et al., 2019). Q : Quartile.

À titre de comparaison, la réduction en pourcentage de LDL cholestérol par ces inhibiteurs de PCSK9 ne semble pas être influencée par les niveaux de base de LDL cholestérol, ce qui suggère que les mécanismes d'épuration de la Lp(a) et des LDL sont distincts. La raison pour laquelle certains individus semblent être résistants à la réduction de la Lp(a) par ces thérapies, reste inconnue.

Comme le rôle du LDLR dans le catabolisme de la Lp(a) est très controversé, la réduction de la Lp(a) par les anticorps anti-PCSK9 a surpris les chercheurs. Cela a conduit à la publication de nombreuses études mécanistiques *in vitro* tentant de comprendre ces résultats. Certains chercheurs soulignent l'importance du LDLR (Raal et al., 2016; Romagnuolo et al., 2015) alors que d'autres suggèrent, au contraire, un effet nul de ce récepteur et proposent des mécanismes

alternatifs impliquant d'autres récepteurs ou affectant la production de Lp(a) (Sharma et al., 2017; Tavori et al., 2016a; Villard et al., 2016).

Les résultats des études cinétiques basées sur l'injection d'isotopes stables *in vivo* ont ajouté une incertitude supplémentaire au débat. Une étude du groupe de Watts a exploré l'impact de l'evolocumab seul et en combinaison avec l'atorvastatine, sur la production et la clairance de l'apo(a). Ils ont constaté que l'evolocumab en monothérapie diminuait significativement les taux de production de l'apo(a) de 36% mais n'avait aucun effet sur son catabolisme. À l'inverse, en combinaison avec l'atorvastatine, aucun effet sur le taux de production d'apo(a) n'a été observé alors que sa vitesse de catabolisme était augmentée de 58%, suggérant un effet important du LDLR lorsque celui-ci est fortement surexprimé (**Figure 36**) (Pirillo and Catapano, 2018; Watts et al., 2018). Notre groupe n'a confirmé qu'une partie de ces observations en montrant chez des macaques, que l'alirocumab en monothérapie diminuait la production d'apo(a) de 42% et n'avait aucun effet sur son catabolisme (Croyal et al., 2018). A l'inverse, une étude réalisée chez l'Homme par l'équipe de Ginsberg n'a révélé aucun changement significatif dans les taux de production (-9%,  $p = 0,6$ ), ni dans le catabolisme de l'apo(a) (+24,6%,  $p = 0,09$ ) après un traitement par alirocumab en monothérapie (Reyes-Soffer et al., 2017). Il n'est pas exclu que PCSK9 puisse affecter à la fois la production et la clairance de la Lp(a). Son action sur la Lp(a) pourrait être modulée par ses concentrations circulantes et/ou par sa capacité à inhiber le LDLR et d'autres récepteurs potentiels de la Lp(a).



**Figure 36** – Mécanisme potentiel des inhibiteurs de PCSK9 avec et sans statines sur la Lp(a). (A) En présence d'anticorps anti-PCSK9, PCSK9 circulant est séquestré. Ainsi, le LDLR est recyclé à la surface des cellules. L'inhibition de PCSK9 diminue la production de Lp(a) par des mécanismes inconnus. Les complexes Lp(a)-PCSK9 pourraient être reconnus par l'anticorps anti-PCSK9, favorisant une voie d'élimination alternative. (B) En présence de statine et d'anticorps anti-PCSK9, l'expression et le recyclage du LDLR sont augmentés, conduisant à une réduction massive des particules de LDL. Cela augmente le nombre de LDLR libres et disponibles pour la liaison avec la Lp(a) conduisant à une augmentation de son absorption. Dans ces conditions, d'autres récepteurs pourraient également contribuer à l'élimination de Lp(a) (extrait de *Pirillo and Catapano, 2018*).

### 3.2.2. SiRNA anti-PCSK9

Les siRNA (« *Small interfering RNA* ») sont de petits ARN synthétiques doubles brins de 21 à 23 dinucléotides, pouvant inactiver l'expression de gènes cibles, en reconnaissant la séquence nucléotidique parfaitement complémentaire de l'ARN messager. Le mécanisme des siRNA implique un complexe protéique RISC (« *RNA-Induced Silencing Complex* ») nécessaire pour cliver et dégrader l'ARN messager ciblé (*Elbashir et al., 2001; Fire et al., 1998*).

L'inclisiran est un siRNA anti-PCSK9 fabriqué à partir de 44 nucléotides chimiquement modifiés formant 21 paires de bases et deux bases libres. Afin de limiter la dose et le volume de médicament injecté, cet siRNA synthétique double brins est conjugué à une N-acétylgalactosamine (GalNAc) qui est un ligand des récepteurs ASGPR (« Asialoglycoprotein Receptor ») spécifique des hépatocytes. En 24 heures après une injection intraveineuse ou sous cutanée, l'inclisiran est indétectable dans le plasma grâce à une absorption rapide par l'hépatocyte due à la liaison de haute affinité de son groupement GalNAc avec les récepteurs ASGPR. Dans le cytoplasme, le brin sens du siRNA est incorporé au complexe protéique RISC (« RNA-Induced Silencing Complex ») qui s'hybride aux ARN messagers codant spécifiquement pour PCSK9. Les ARN messagers sont alors clivés et dégradés ce qui diminue la synthèse de PCSK9 d'environ 70% dans le foie, entraînant ainsi une augmentation de l'expression du LDLR à la surface des hépatocytes et une diminution des concentrations de LDL cholestérol d'au moins 50% jusqu'à 90 jours après injection (Nishikido and Ray, 2018; Khvorova, 2017; Ray et al., 2017).

Récemment, l'étude de phase II ORION-1 réalisée sur 501 patients a révélé que l'inclisiran abaissait la Lp(a) plus modestement que les anticorps monoclonaux. Les réductions médianes de Lp(a) après 180 jours oscillaient globalement entre 14 et 18% dans les groupes à dose unique (200, 300 et 500 mg d'inclisiran) et entre 15 et 26% dans les groupes à deux doses (100, 200 ou 300 mg d'inclisiran le 1<sup>er</sup> jour et le 90<sup>ème</sup> jour). Cependant, ces diminutions n'étaient pas statistiquement significatives (Ray et al., 2018).

### 3.3. L'impact d'autres hypolipémiants sur la Lp(a)

#### 3.3.1. La niacine

Jusqu'à récemment, la niacine, aussi appelée vitamine B3 ou d'acide nicotinique, était la seule thérapie connue pour abaisser la Lp(a) à des doses supraphysiologiques. La niacine réduit la Lp(a) d'environ 30%, en plus de réduire le LDL cholestérol d'environ 15% (Albers et al., 2013; AIM-HIGH Investigators et al., 2011). Le mécanisme d'action de la niacine sur la réduction des taux de Lp(a) n'est pas clair mais se situe principalement au niveau de la production d'apo(a) (Croyal et al., 2015; Ooi et al., 2015) et pourrait impliquer une réduction de la transcription du gène *LPA* (Chennamsetty et al., 2012b). Par ailleurs une récente étude a montré que la diminution relative de Lp(a) induite par la niacine était plus élevée chez les patients porteurs de grandes isoformes d'apo(a) par rapport aux patients porteurs de petites isoformes (Parish et al., 2018). En 2015, deux études cinétiques se sont intéressées à l'effet d'un traitement par la niacine

sur la Lp(a). La première étude indique que la niacine induit une réduction des concentrations plasmatiques d'apo(a) de 20%, de sa vitesse de production de 50%, et de sa vitesse de catabolisme de 37% chez des patients hypertriglycéridémiques. Les concentrations d'apoB100 et de PCSK9 étaient également diminuées par la niacine mais ne semblaient pas être corrélées statistiquement aux paramètres cinétiques d'apo(a), suggérant un mécanisme d'épuration de la Lp(a) indépendant du LDLR (Croyal et al., 2015). La seconde étude montre chez des patients diabétiques de type 2, que la niacine diminue les taux plasmatiques de Lp(a) de 27% en diminuant la production d'apo(a) de 42%, sans toutefois influencer son catabolisme (Ooi et al., 2015). Aussi, la réduction des taux plasmatiques de PCSK9 induite par la niacine n'était pas associée aux paramètres cinétiques de l'apo(a). Une étude plus ancienne a investigué l'effet de la niacine sur la production d'apo(a) par des hépatocytes primaires humains et chez des souris transgéniques exprimant l'apo(a) humaine. Après traitement de ces animaux à la niacine, la transcription du gène *LPA* dans les hépatocytes des souris transgéniques était diminuée de plus de 50%. Des résultats identiques ont été obtenus sur les hépatocytes primaires après les avoir supplémentés avec la niacine (Chennamsetty et al., 2012b).

Les grands essais cliniques AIM-HIGH et HPS2-THRIVE n'ont cependant pas montré de bénéfice cardiovasculaire de la niacine, même dans un sous-groupe de patients avec une Lp(a) élevée (HPS2-THRIVE Collaborative Group et al., 2014; Albers et al., 2013; AIM-HIGH Investigators et al., 2011). L'intérêt de la niacine en tant que thérapie pour réduire la Lp(a) s'est estompé et les dernières recommandations suggèrent de ne plus l'utiliser en raison de son manque d'efficacité et de ses effets indésirables (Wilson et al., 2019).

### 3.3.2. Les inhibiteurs de CETP

La CETP sert d'intermédiaire pour l'échange d'esters de cholestérol et de triglycérides entre les lipoprotéines à apoB100 (source de triglycérides) et les HDL (source d'esters de cholestérol). Le blocage de ce transfert par des inhibiteurs de CETP augmente les niveaux de HDL cholestérol et réduit les niveaux de LDL cholestérol (Barter and Rye, 2012; Barter et al., 1982). L'anacetrapib baisse également d'environ 35% les taux de Lp(a) chez les sujets atteints d'hypercholestérolémie en diminuant la production d'apo(a) sur une période de huit semaines (Thomas et al., 2017). Ce résultat a été confirmé dans un grand essai clinique de phase III incluant 30 449 patients cardiovasculaires. Pendant 4 ans, l'ajout quotidien de 100 mg d'anacetrapib à des statines à forte dose a réduit la Lp(a) de 25% en moyenne (HPS3/TIMI55-REVEAL Collaborative Group et al., 2017). Un autre inhibiteur de CETP, l'evacetrapib, réduit

aussi la Lp(a) de 30 à 40% sur une période de 12 semaines à une dose de 500 mg en monothérapie ou en association avec des statines (Nicholls et al., 2016). TA-8995, un nouvel inhibiteur de CETP, a été testé dans un essai clinique de phase II chez 364 sujets avec des taux de LDL cholestérol et de HDL cholestérol compris entre 2,5 et 4,5 mmol/L et entre 0,8 et 1,8 mmol/L, respectivement (Hovingh et al., 2015). À la dose la plus élevée de TA-8995 (10 mg), la réduction du LDL cholestérol par rapport au groupe placebo était de 45% et l'augmentation du HDL-C était de 179%. La Lp(a) a également significativement diminué de 33% par rapport au groupe placebo (Hovingh et al., 2015). Alors que les inhibiteurs de CETP améliorent considérablement le profil lipidique en augmentant le HDL cholestérol et en diminuant la Lp(a) et le LDL cholestérol, leur développement a été arrêté suite à la publication d'essais cliniques montrant l'absence de bénéfice sur le risque cardiovasculaire (Armitage et al., 2019; HPS3/TIMI55–REVEAL Collaborative Group et al., 2017).

### 3.3.3. Mipomersen

Le mipomersen est un oligonucléotide antisens (ASO) anti-apoB100 de deuxième génération. Bien que l'approche biotechnologique des ASO soit légèrement différente des siRNA, son rôle est de bloquer l'expression d'un gène en ciblant spécifiquement l'ARN messenger transcrit. Ce sont des oligonucléotides chimiquement synthétisés de 12 à 30 nucléotides qui peuvent, selon leur conception, favoriser le clivage, la dégradation, ou le blocage de l'ARN messenger. Contrairement aux siRNA, le mécanisme des ASO n'implique pas le complexe RISC mais peut faire intervenir l'ARNase H1 pour cliver l'ARN messenger (Langsted and Nordestgaard, 2019).

À ce jour, le mipomersen n'a été approuvé que dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote (Santos et al., 2015). Dans quatre essais cliniques de phase III, 382 patients atteints d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote et homozygote ainsi que des patients avec une hypercholestérolémie sévère, ont été sélectionnés. Ces patients ont reçu de manière randomisée et hebdomadaire, 200 mg de mipomersen ou de placebo, pendant 26 semaines. Le pourcentage moyen de diminution de la Lp(a) à 28 semaines était significativement plus élevé de 26% dans le groupe ayant reçu le mipomersen par rapport au groupe placebo (Santos et al., 2015). D'après une étude cinétique du groupe de Reyes-Soffer, la réduction de Lp(a) de 21% observée chez 14 sujets sains ayant reçu le mipomersen s'explique uniquement par une augmentation du taux de catabolisme de l'apo(a) de 27% (Nandakumar et al., 2018). Les auteurs suggèrent que l'absence d'effet au niveau de la production de Lp(a) s'expliquerait par un pool d'apoB100 indépendant de celui des VLDL synthétisées par le foie,

qui serait destiné à l'assemblage de la Lp(a). La deuxième hypothèse, peu probable, repose sur une inhibition d'apoB100 insuffisante pour affecter la production de la Lp(a) (Nandakumar et al., 2018). L'absence d'apoB100 pourrait aussi entraîner la sécrétion d'apo(a) libre dans le plasma mais cette hypothèse n'a pas été étudiée. En raison de la découverte de stéatoses hépatiques et de l'augmentation des enzymes du foie chez les patients traités, le mipomersen a été retiré du marché et aucune autre étude mécanistique n'a été publiée.

### 3.3.4. Lomitapide

Le lomitapide est un inhibiteur de la MTTP, une protéine associée au réticulum endoplasmique des entérocytes et des hépatocytes et impliquée dans l'assemblage des chylomicrons dans l'intestin et des VLDL dans le foie avant leur sécrétion (Gibbons et al., 2004). D'après une étude clinique de phase III, lorsque le lomitapide est associé à un régime pauvre en graisses et à des statines, il abaisse sensiblement et de manière stable les niveaux de LDL cholestérol de 50% chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale homozygote (Cuchel et al., 2013). Avec une dose de 40 mg par jour, le lomitapide induit également une réduction de Lp(a) d'environ 15% après 56 semaines de traitement mais cette différence n'était plus significative au bout de 78 semaines (Cuchel et al., 2013). Une autre étude publiée en 2015 a confirmé ces observations en ne montrant aucune différence significative des taux de Lp(a) entre le groupe de patients traités avec le lomitapide en plus de l'aphérèse et l'autre groupe de patients traités uniquement par aphaérèse (Stefanutti et al., 2015).

## 3.4. Le traitement de l'hyper-Lp(a)

### 3.4.1. L'aphérèse

L'élimination extracorporelle par aphaérèse est le traitement autorisé le plus efficace pour abaisser drastiquement les niveaux de Lp(a) (Vogt, 2017). Il existe plusieurs types d'aphérèse. Le premier type consiste à capturer les lipoprotéines athérogènes grâce à des colonnes chargées en anticorps anti-apoB100 ou anti-apo(a). Le second est basé sur la filtration des lipoprotéines en fonction de leur taille, sur des membranes microporeuses. Le troisième repose sur le principe d'affinité non immunologique des lipoprotéines à apoB100, soit en les adsorbant sur un gel de sulfate de dextran-cellulose ou dans une cartouche remplie de billes poreuses de polyacrylamide, soit en les précipitant par l'héparine en milieu acide (Pokrovsky et al., 2016). Toutes ces techniques entraînent une réduction de la Lp(a) en moyenne d'au moins 50%, la plus efficace étant l'aphérèse avec des anticorps anti-apo(a), permettant une réduction de Lp(a)

jusqu'à 88% (Pokrovsky et al., 2016). Dans une étude prospective, 120 patients atteints de coronaropathies et présentant des niveaux de Lp(a) supérieurs à 200 nmol/L (~80 mg/dL) ont été traités par aphasère en plus d'un traitement hypolipémiant maximal pendant cinq ans. Les taux médians de Lp(a) ont diminué de manière significative de 400 nmol/L (~160 mg/dL) à 107 nmol/L (~43 mg/dL) équivalant à une réduction moyenne de 60 à 70%, après aphasère. En plus de la réduction de la Lp(a), l'aphasère a permis une diminution par dix du taux annuel d'événements cardiovasculaires, pendant cinq ans (Jaeger et al., 2009). Dans une autre étude observationnelle portant sur 170 patients avec des taux de Lp(a) supérieurs à 100 mg/dL (~250 nmol/L), l'aphasère a entraîné une réduction significative de Lp(a) de 71 à 110 mg/dL, ainsi qu'une réduction du taux de nouveaux événements cardiovasculaires par trois à l'issue de la première année et par dix à l'issue de la deuxième année (Leebmann et al., 2013). Outre la diminution des lipoprotéines athérogènes, l'aphasère entraîne aussi la réduction des marqueurs de l'inflammation et l'amélioration de la fluidité sanguine (Moriarty, 2015). En effet, l'aphasère permet d'éliminer les phospholipides oxydés (Arai et al., 2012) et la phospholipase A2 (Moriarty and Gibson, 2005), associés à la Lp(a), ainsi qu'à d'autres lipoprotéines à apoB100.

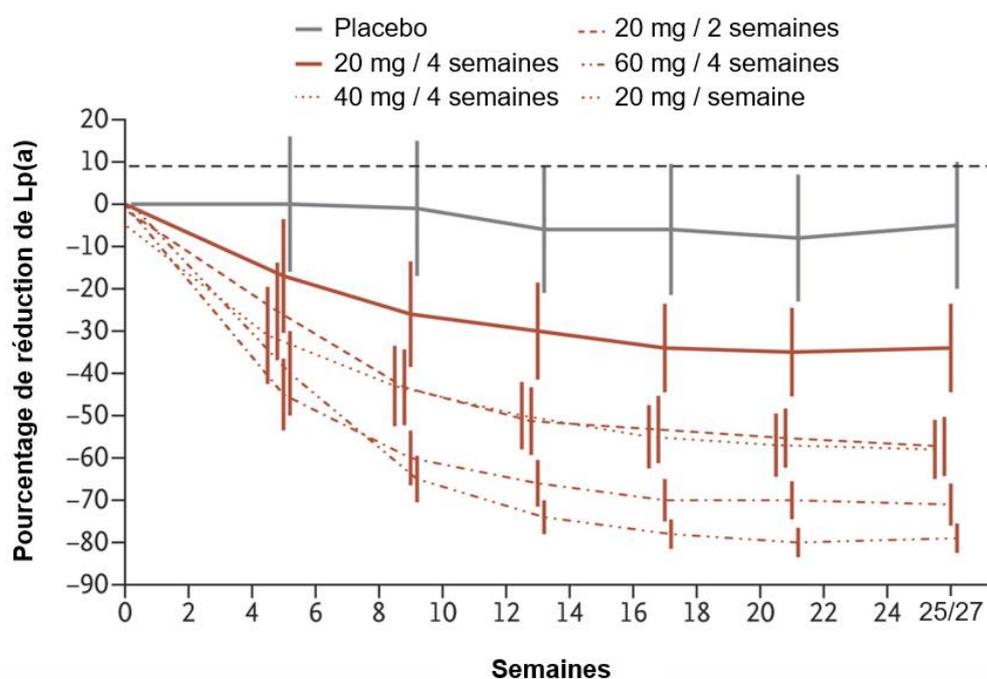
L'un des inconvénients notables de l'aphasère réside dans son inefficacité à réduire durablement la Lp(a). Après une séance d'aphasère, la Lp(a) retrouve rapidement ses concentrations plasmatiques basales entre 7 et 14 jours suivant la procédure (Ma et al., 2019b; Tselmin et al., 2017), nécessitant ainsi des séances hebdomadaires répétées, invasives et coûteuses avec un accès souvent limité (Kelly and Hemphill, 2017).

### 3.4.2. AKCEA-APO(a)-L<sub>Rx</sub>

AKCEA-APO(a)-L<sub>Rx</sub> ou APO(a)-L<sub>Rx</sub> est un oligonucléotide antisens chimiquement modifié de deuxième génération, conçu pour réduire la synthèse d'apo(a) dans le foie (Tsimikas, 2017). En 2015, lors d'une étude de phase I, 47 individus sains de 18 à 65 ans avec des niveaux de Lp(a) de 25 nmol/L (10 mg/dL) ou plus, ont été randomisés pour recevoir soit le placebo, soit une dose unique, soit plusieurs doses consécutives sur 22 jours d'APO(a)<sub>Rx</sub>. Alors que des injections uniques d'APO(a)<sub>Rx</sub> (50, 100, 200 ou 400 mg) n'ont pas significativement diminué les concentrations de Lp(a) après 30 jours de suivi, les six doses consécutives d'APO(a)<sub>Rx</sub> (100, 200, 300 mg) ont entraîné des diminutions moyennes de Lp(a) de 40%, 59% et 78% pour les patients ayant reçu 100, 200 et 300 mg d'ASO par rapport au groupe placebo. Les niveaux de phospholipides oxydés liés à l'apo(a) et à l'apoB100 étaient également significativement plus

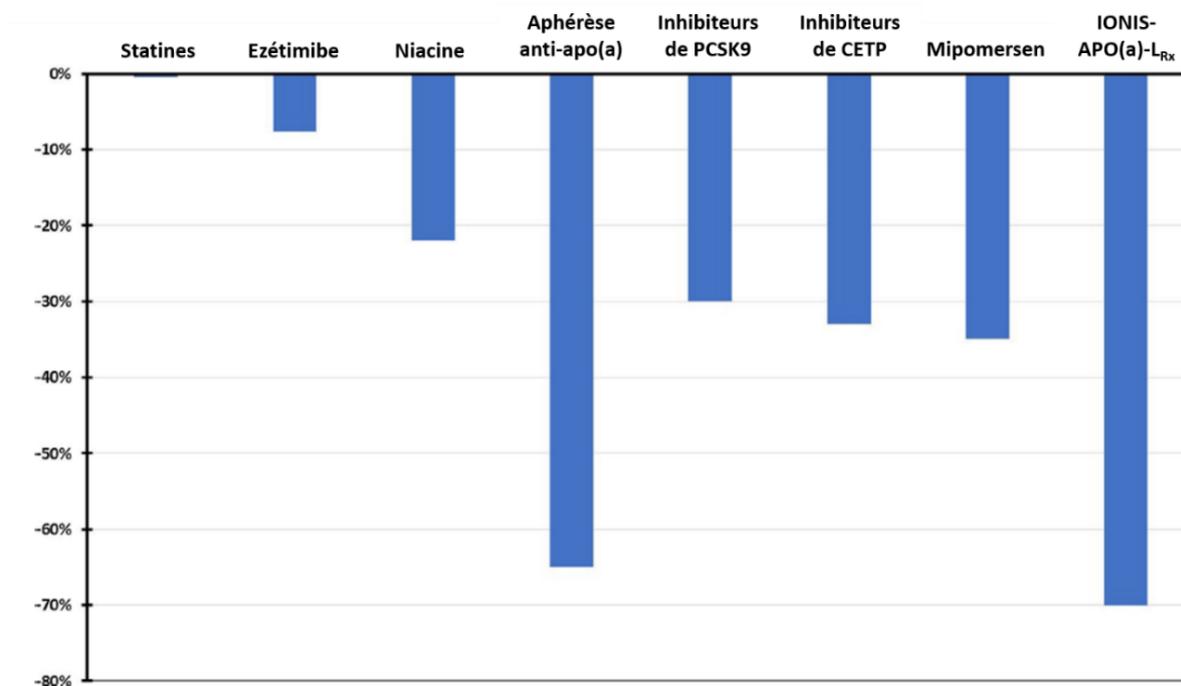
bas à l'issue de la cinquième semaine, avec une diminution maximale de 60% pour les patients ayant reçu six doses consécutives d'APO(a)<sub>Rx</sub> à 300 mg (Tsimikas et al., 2015).

En 2016, lors d'un essai clinique de phase II, 64 patients avec des niveaux élevés de Lp(a) ont reçu une injection hebdomadaire de 100, 200, ou 300 mg d'APO(a)<sub>Rx</sub> pendant quatre semaines ou des injections hebdomadaires de placebo pendant douze semaines (Viney et al., 2016). Les patients ayant reçu des injections d'APO(a)<sub>Rx</sub> ont présenté une réduction de Lp(a) comprise entre 67% et 72% par rapport aux patients ayant reçu le placebo. Une diminution significative des phospholipides oxydés et du taux de migration des monocytes a aussi été observée après traitement par APO(a)<sub>Rx</sub>, confirmant l'influence de la Lp(a) dans les processus inflammatoires favorisant l'athérosclérose (Viney et al., 2016). En 2020, une nouvelle étude clinique de phase II a exploré l'effet d'un traitement par l'IONIS-APO(a)-L<sub>Rx</sub> sur les niveaux de Lp(a) (Tsimikas et al., 2020). À la différence d'APO(a)<sub>Rx</sub>, AKCEA-APO(a)-L<sub>Rx</sub> contient en plus un groupement GalNAc qui lui permet d'être absorbé sélectivement par les hépatocytes. Cet essai clinique réalisé sur 286 patients atteints de maladies cardiovasculaires et présentant des taux de Lp(a) supérieurs à 60 mg/dL (150 nmol/L), a démontré qu'une injection hebdomadaire de seulement 20 mg d'AKCEA-APO(a)-L<sub>Rx</sub> induisait une réduction des niveaux de Lp(a) de 80%, de ses phospholipides oxydés de 70% et de LDL cholestérol de 20% [corrigés avec la valeur de cholestérol de Lp(a)] (Figure 37) (Tsimikas et al., 2020).



**Figure 37** – Réduction relative de Lp(a) par différentes doses d'AKCEA-APO(a)-L<sub>Rx</sub> au cours du temps (traduit de Tsimikas et al., 2020).

De plus, la réduction de la Lp(a) induite par AKCEA-APO(a)-L<sub>Rx</sub> réduit également l'état pro-inflammatoire des monocytes circulants chez les patients présentant des concentrations élevées de Lp(a), suggérant un effet probablement bénéfique sur le risque athéromateux chez ces patients (Stiekema et al., 2020). Toutefois, l'impact d'une telle réduction de Lp(a) sur le risque cardiovasculaire n'a pas encore été mesuré au niveau clinique, mais ce traitement par ASO semble très prometteur pour traiter de manière efficace les patients à haut risque cardiovasculaire et atteints d'hyper-Lp(a). La **Figure 38** résume l'impact des différents traitements actuellement disponibles, sur la réduction de Lp(a).



**Figure 38** – Réduction relative de Lp(a) par différentes thérapies (traduit de *Gencer and Mach, 2020*).

En attendant les résultats des futurs essais cliniques sur AKCEA-APO(a)-L<sub>Rx</sub>, les cliniciens n'ont pas d'autres alternatives que de traiter les patients atteints d'hyper-Lp(a) par aphérese de manière hebdomadaire, ce qui est très contraignant pour les sujets concernés.

De plus, la Lp(a) et le risque cardiovasculaire associé restent très méconnus des professionnels de santé, en particulier en France où très peu de laboratoires sont en mesure de correctement la doser. Les particularités de la Lp(a) compliquent davantage la recherche puisque ses mesures sont souvent biaisées par la taille de l'apo(a) qui ne peut être déterminée que par certaines techniques biochimiques ou génétiques relativement complexes à mettre en œuvre.

## 4. Approches méthodologiques pour l'étude de la Lp(a)

D'un point de vue clinique, la quantification de la Lp(a) plasmatique est l'approche la plus fiable pour estimer le risque cardiovasculaire qui lui est associé (Cao et al., 2018). Comme le gène *LPA* et ses multiples allèles retrouvés dans la population ont une influence prédominante sur la variabilité des niveaux de Lp(a), l'étude de cette lipoprotéine nécessite des techniques biochimiques et moléculaires particulières par rapport à l'étude des lipoprotéines « classiques ».

### 4.1. Problématique des unités de mesure de la Lp(a)

Idéalement, les concentrations de Lp(a) devraient être rapportées en concentrations molaires (nmol/L) plutôt qu'en concentrations massiques (mg/dL) car c'est le nombre de molécules d'apo(a) qui détermine le nombre de particules de Lp(a), indépendamment de la taille de l'apo(a). En effet, puisqu'une particule de Lp(a) est composée d'une seule et unique apo(a), et sachant que l'apo(a) ne circule pas ou très peu sous forme libre (< 5%), le nombre de moles d'apo(a) est égal au nombre de moles de Lp(a) (Albers et al., 1996). Le facteur de conversion entre les valeurs en mg/dL et les valeurs en nmol/L varie de 2,85 pour les petites isoformes d'apo(a), à 1,85 pour les plus larges. Afin de faciliter les interprétations, un facteur moyen de 2,5 a été défini, à tort, puisqu'il génère des écarts substantiels entre les valeurs calculées et la réalité physiologique (Brown et al., 2010).

### 4.2. Les méthodes immunochimiques

Le polymorphisme de l'apo(a) entraîne des difficultés importantes pour normaliser les tests immunologiques nécessaires à la comparaison des concentrations obtenues dans différentes études (Marcovina and Albers, 2016). De nombreuses méthodes telles que l'ELISA (« Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »), la néphélométrie ou l'immuno-turbidimétrie ont été développées pour le dosage de la Lp(a). Ces méthodes font appel à des interactions très spécifiques de type antigène-anticorps qui, en fonction de leur type, vont entraîner soit l'apparition d'une coloration lumineuse (ELISA) ou d'un trouble (immuno-turbidimétrie), soit la déviation de la lumière dans une direction donnée (néphélométrie). L'utilisation de différents calibrants et anticorps a entraîné des valeurs de concentrations très hétérogènes et difficilement comparables entre les différents kits (Tate et al., 1998). Un problème majeur provient du nombre de répétitions du domaine KIV<sub>2</sub> qui génère plus de 40 isoformes d'apo(a) de tailles différentes. Par ailleurs, la plupart des patients possède deux isoformes circulantes de tailles différentes. Les anticorps utilisés dans les différents kits commerciaux ne sont pas

systématiquement caractérisés mais ciblent généralement le KIV<sub>2</sub>. Dans ce cas, les concentrations massiques plasmatiques des petites isoformes, généralement associées à des niveaux élevés de Lp(a), sont sous-estimées, alors que les concentrations plasmatiques des grandes isoformes, généralement associées à des niveaux plus faibles de Lp(a), sont surestimées (Marcovina et al., 1995). Le biais relatif lié à la taille de l'apo(a) augmente avec le nombre de KIV<sub>2</sub> et peut entraîner une surestimation des concentrations de Lp(a) de 25 à 35%, notamment chez les individus porteurs d'isoformes d'apo(a) de grandes tailles (Marcovina et al., 1995). Cela se traduit néanmoins par un biais absolu relativement faible de quelques milligrammes par décilitre (mg/dL), ainsi qu'un biais relatif pour les individus exprimant de petites isoformes inférieur à 10%. En revanche, lorsque le nombre de KIV est inférieur ou égal à 16, les biais relatif et absolu peuvent devenir assez prononcés. Bien que ces isoformes très courtes soient peu fréquentes dans la population, le biais généré par ces kits peut entraîner une sous-estimation de la concentration de Lp(a) et du risque cardiovasculaire associé, notamment dans l'analyse de grandes cohortes (Marcovina et al., 1995), ces isoformes étant par ailleurs les plus à risque. D'autres kits, qui utilisent des anticorps reconnaissant une région non répétée de l'apo(a), donnent aussi des concentrations massiques en mg/dL, ou plus rarement, des concentrations molaires (nmol/L) d'apo(a) ou de Lp(a). Malheureusement, ces kits entraînent également des valeurs très variables. Une étude a comparé les valeurs de Lp(a) obtenues par six kits de dosage sur 144 échantillons de plasma (Scharnagl et al., 2019). Les biais observés augmentaient de façon importante dans la plage de concentrations supérieures à 80 mg/dL (~200 nmol/L) avec parfois des différences de plus de 50 mg/dL (~125 nmol/L). Les auteurs suggèrent que ces biais proviennent très probablement de la différence de composition (souvent non divulguée) des standards fournis par les fabricants, souvent générés à partir de Lp(a) isolée de plasma de plusieurs patients différents (Scharnagl et al., 2019). Un autre inconvénient de ces techniques immunochimiques réside dans la qualité des échantillons à doser. La congélation à -20°C du plasma sur du long terme affecte l'immuno-réactivité de l'apo(a), en particulier pour ses petites isoformes (Kronenberg et al., 1996; Craig et al., 1992), ce qui peut entraîner une mauvaise estimation de l'association entre les taux de Lp(a) et le risque de maladies cardiovasculaires dans de larges cohortes. Même si aucune standardisation des anticorps primaires ni des calibrants n'a été faite, ces kits sont tout de même reconnus par la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) et approuvés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour mesurer la Lp(a) (Dati et al., 2004).

Il n'existe toujours pas à ce jour de consensus clair pour la mesure de la Lp(a) aujourd'hui. Dans un avenir proche, la mesure des concentrations molaires d'apo(a) par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide pourrait fournir une alternative fiable aux dosages immunochimiques. De plus en plus d'efforts sont d'ailleurs fournis par les spécialistes afin de développer des protocoles robustes et inscrire cette technique parmi les méthodes de référence pour le dosage de biomarqueurs et d'autres molécules circulantes.

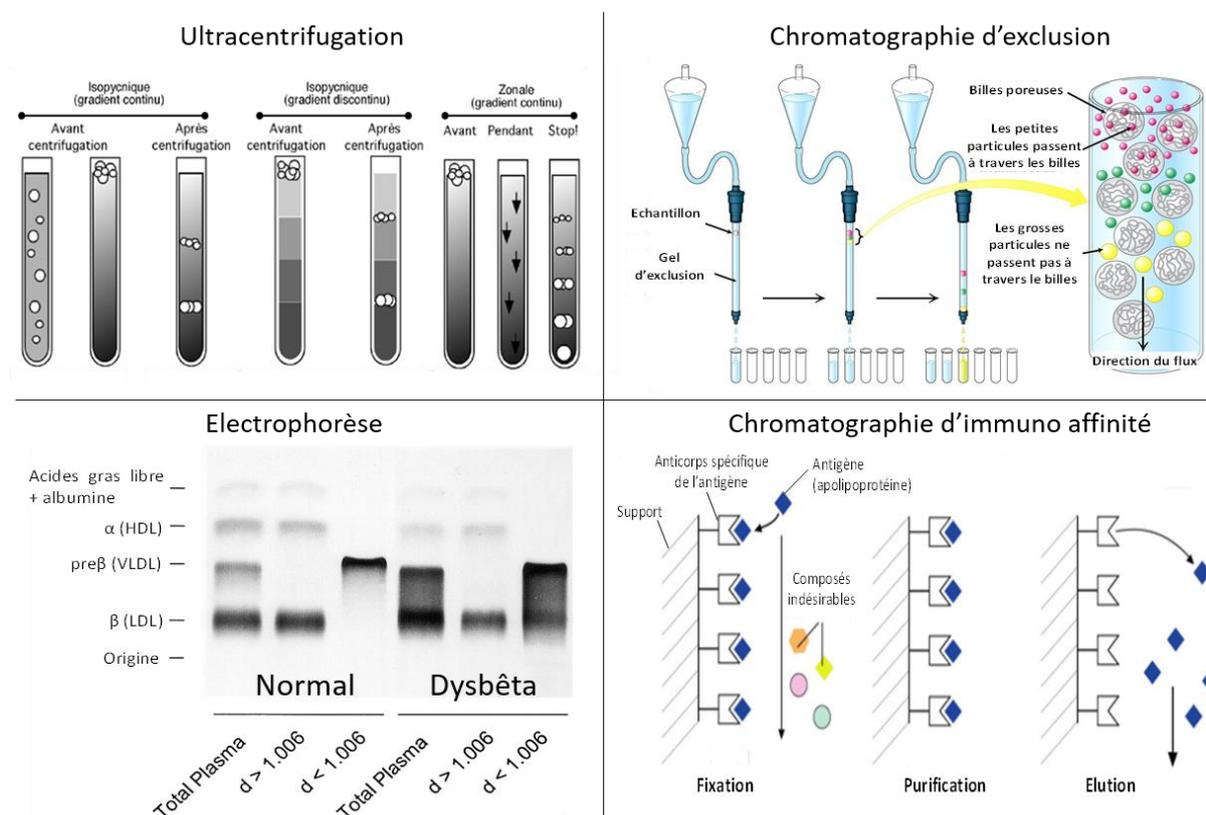
### 4.3. La spectrométrie de masse

Plusieurs groupes dont le notre proposent aujourd'hui l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS) comme alternative aux tests immunologiques (Hoofnagle and Wener, 2009) pour le dosage des apolipoprotéines (Croyal et al., 2016; van den Broek et al., 2016). La LC-MS/MS permet l'analyse ciblée et multiplexée de multiples protéines *via* leurs peptides signatures dits protéotypiques. Ces derniers sont générés après protéolyse enzymatique du pool de protéines contenues dans l'échantillon biologique. Les peptides sont ensuite séparés par chromatographie en phase liquide puis détectés par spectrométrie de masse. Cette approche permet donc, en une seule injection, d'obtenir la concentration absolue des protéines ciblées, d'identifier certaines modifications polymorphiques et de mesurer l'incorporation d'un traceur isotopique dans le cadre d'études cinétiques. Cependant, la LC-MS/MS requiert une préparation particulière et rigoureuse des échantillons avant l'analyse.

#### 4.3.1. Préparation des échantillons pour l'analyse par LC-MS/MS

##### - Traitement préliminaire des échantillons

Les apolipoprotéines sont spécifiquement liées aux lipoprotéines. Dans le cadre d'une quantification dans les fractions lipoprotéiques, il est donc indispensable de procéder préalablement à une séparation des lipoprotéines. Pour ce faire, il existe de nombreuses techniques comme l'ultracentrifugation (séparation selon la densité), l'électrophorèse (séparation selon la charge électrique), la chromatographie d'exclusion stérique (séparation selon la taille) ou la chromatographie par immuno-affinité (séparation par interactions antigène/anticorps) (**Figure 39**) (Gordon et al., 2010; Chajek and Fielding, 1978; Chin and Blankenhorn, 1968; Havel et al., 1955). Cette étape n'est pas systématique puisqu'il est possible de quantifier les apolipoprotéines par LC-MS/MS directement dans le plasma ou dans le sérum des patients.

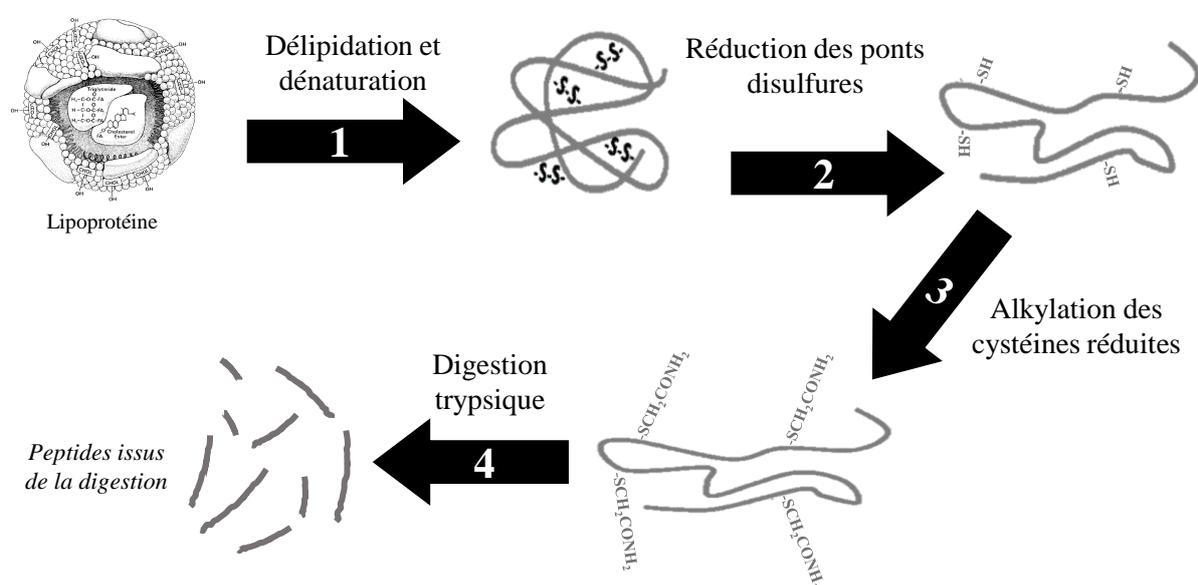


**Figure 39** – Techniques de séparation des différentes classes de lipoprotéines (extrait de *Croyal, 2017* et de *Cohn et al., 1999*).

### - Préparation des échantillons

L'analyse des protéines par LC-MS/MS nécessite de réduire leur taille (très variable d'une apolipoprotéine à une autre, de 8 à 800 kDa), le plus souvent par protéolyse enzymatique *via* la trypsine, afin d'obtenir des fragments peptidiques homogènes et suffisamment petits (entre 800 et 2000 g/mol) pour être détectés de façon fiable par les analyseurs en masse ( $m/z < \sim 2000$ ) (*Croyal, 2017*). Dès lors, les apolipoprotéines doivent être linéarisées pour permettre à la trypsine de les digérer correctement. Dans un premier temps, les échantillons biologiques sont traités avec un détergent ionique compatible avec la spectrométrie de masse, comme le déoxycholate de sodium, afin de décrocher les apolipoprotéines des lipides et des lipoprotéines, et d'inhiber les liaisons non covalentes responsables de leur structure quaternaire (*Proc et al., 2010*). Une deuxième étape permet de réduire les ponts disulfures intra et intermoléculaires des protéines, à l'aide d'un agent réducteur comme le dithiothreitol, l'urée, la guanidine, le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou une phosphine (TCEP). La réduction des ponts disulfures nécessite la protection immédiate des fonctions thiols libres « -SH » pour empêcher la reformation naturelle des ponts disulfures au niveau des cystéines. Pour ce faire, les cystéines sont protégées par

alkylation (carbaméthylation) à l'aide d'iodoacétamide ou d'acide iodoacétique, résultant *in fine* à la linéarisation complète et stable des apolipoprotéines (Croyal, 2017). La troisième étape consiste à digérer les apolipoprotéines par la trypsine (ou une autre endoprotéase) pendant plusieurs heures dans les conditions requises de température et de pH (pH 8 et 37°C sur 12 à 24h pour la trypsine). La trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau des fonctions « carboxy » des lysines et des arginines, sauf lorsqu'elles sont suivies d'une proline (**Figure 40**). Des étapes supplémentaires de purification et de concentration par extraction en phases solide/liquide peuvent aussi être nécessaires afin d'optimiser l'analyse des peptides par spectrométrie de masse (Croyal, 2017; van den Broek et al., 2016).



**Figure 40** – Traitements des échantillons pour l'analyse protéomique.

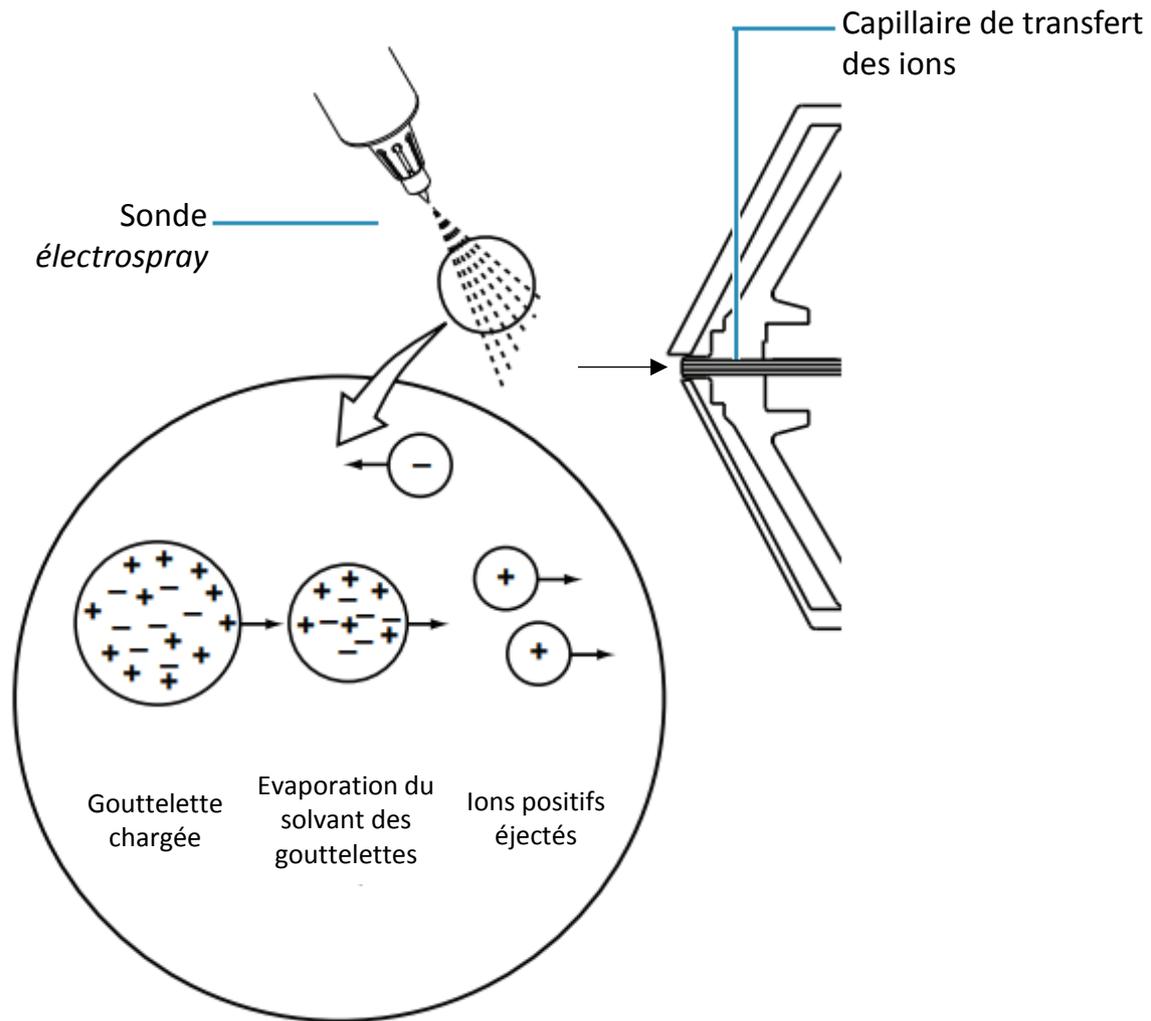
#### 4.3.2. L'analyse LC-MS/MS

**La chromatographie en phase liquide** – Une fois traité, l'échantillon peut être injecté dans le système LC-MS/MS. Avant d'être dirigés vers le spectromètre de masse, les peptides sont séparés et élués les uns des autres par chromatographie en phase liquide (LC), le plus souvent utilisée en mode phase inverse, c'est-à-dire du plus polaire au plus apolaire. La chromatographie est une technique analytique permettant la séparation des molécules d'un mélange en fonction de leur affinité avec deux phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. Les peptides présents dans le mélange vont d'abord être fixés à la phase stationnaire apolaire de la colonne chromatographique (de type C<sub>18</sub> généralement), puis élués séquentiellement au cours du temps (temps de rétention) par la phase mobile la traversant. Cette phase mobile est

constituée de deux solvants miscibles entre eux et de polarités différentes, l'un très polaire (ex : eau ; phase non éluante) et l'autre moins polaire (ex : acétonitrile, méthanol ; phase éluante). La proportion de phase éluante peut rester fixe pendant l'analyse (mode isocratique) ou varier au cours du temps (mode gradient). Les peptides, de structures et de propriétés physico-chimiques différentes, sont ainsi entraînés de façon séquentielle par la phase mobile au cours du temps. Une fois élués, les peptides atteignent le spectromètre de masse pour être analysés (Croyal, 2017). Il est également courant d'ajouter des additifs ou modificateurs dans les phases mobiles afin de favoriser la rétention et le profil chromatographique. Dans le cas des peptides, un acidifiant est souvent préconisé comme l'acide formique ou l'acide trifluoroacétique (TFA). Cependant, cet additif ne doit pas être délétère aux processus d'ionisation inhérents à la spectrométrie de masse, c'est pourquoi le TFA, bien que très efficace en chromatographie, n'est pas considéré pour les analyses LC-MS/MS.

**L'analyse par spectrométrie de masse** – La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant la détection spécifique de molécules à leurs niveaux physiologiques. Son principe réside dans la détection et l'identification structurale d'espèces élémentaires ou moléculaires chargées (ions) à l'état gazeux en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Les systèmes de spectrométrie de masse se composent généralement d'un système d'introduction (ex : chromatographie en phase liquide), d'une source d'ionisation, d'un ou plusieurs analyseurs en masse capables d'identifier les ions générés selon leur rapport  $m/z$ , et d'un détecteur permettant de les compter (Lam and Shui, 2013; Yates, 1998).

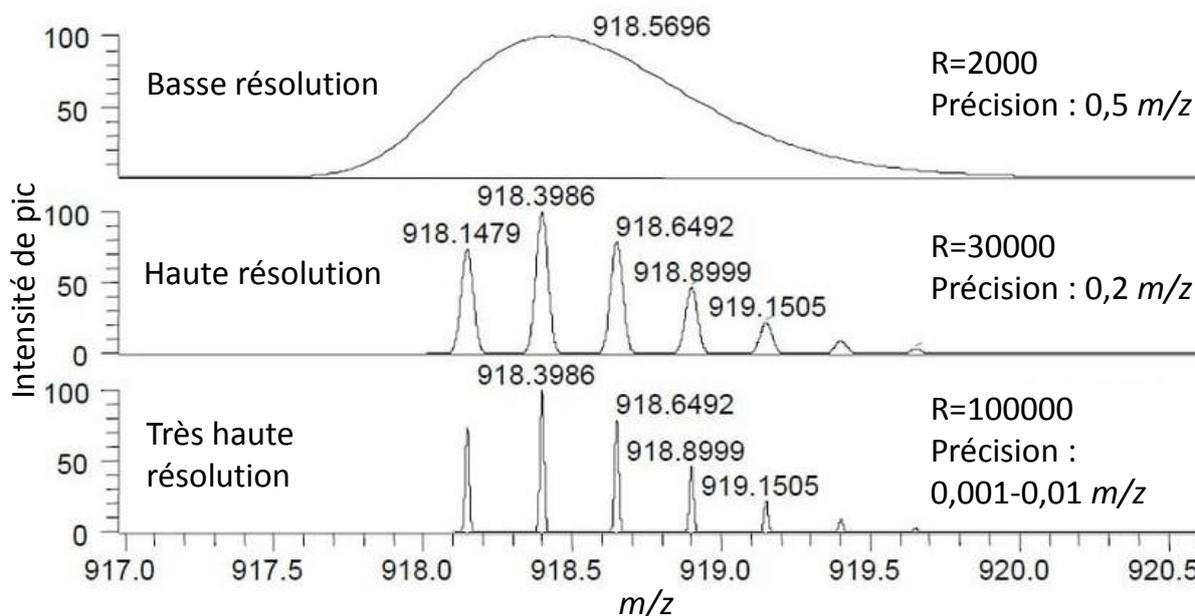
Les sources d'ionisation par *electrospray* (ESI) sont majoritairement utilisées pour les couplages à la LC, en particulier pour l'analyse des peptides et des protéines. De façon très schématique, l'ESI est une source d'ionisation douce permettant de transformer les molécules ciblées, et présentes à l'état liquide en sortie de LC, en ions gazeux positifs (mode préférentiel pour les peptides), ou négatifs. Ces ions sont ensuite dirigés vers l'analyseur en masse où ils seront séparés ou filtrés en fonction de leur rapport  $m/z$  (Figure 41) (Croyal, 2017; Buré, 2005).



**Figure 41** – Principe de l'électrospray en mode positif (extrait de <http://thermofisher.com>).

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) consiste à combiner plusieurs analyseurs en masse. Un ion précurseur (peptide signature chargé) de rapport  $m/z$  est sélectionné dans le premier système. Cet ion est ensuite dirigé vers une cellule de collision où, sous l'influence d'un gaz inerte (Argon, Helium), son énergie interne sera augmentée par collision jusqu'à sa dissociation. Un second analyseur mesure le rapport  $m/z$  soit d'un fragment majoritaire et spécifique, soit de tous les ions issus de la fragmentation. Pour l'analyse des peptides, cette approche est la mieux adaptée puisqu'elle assure une double sélectivité au-delà du temps de rétention chromatographique, d'une part avec l'ion précurseur, d'autre part avec le ou les ions produit(s) par fragmentation qui sont spécifiques à la séquence du peptide (Yassine et al., 2013; Yates, 1998).

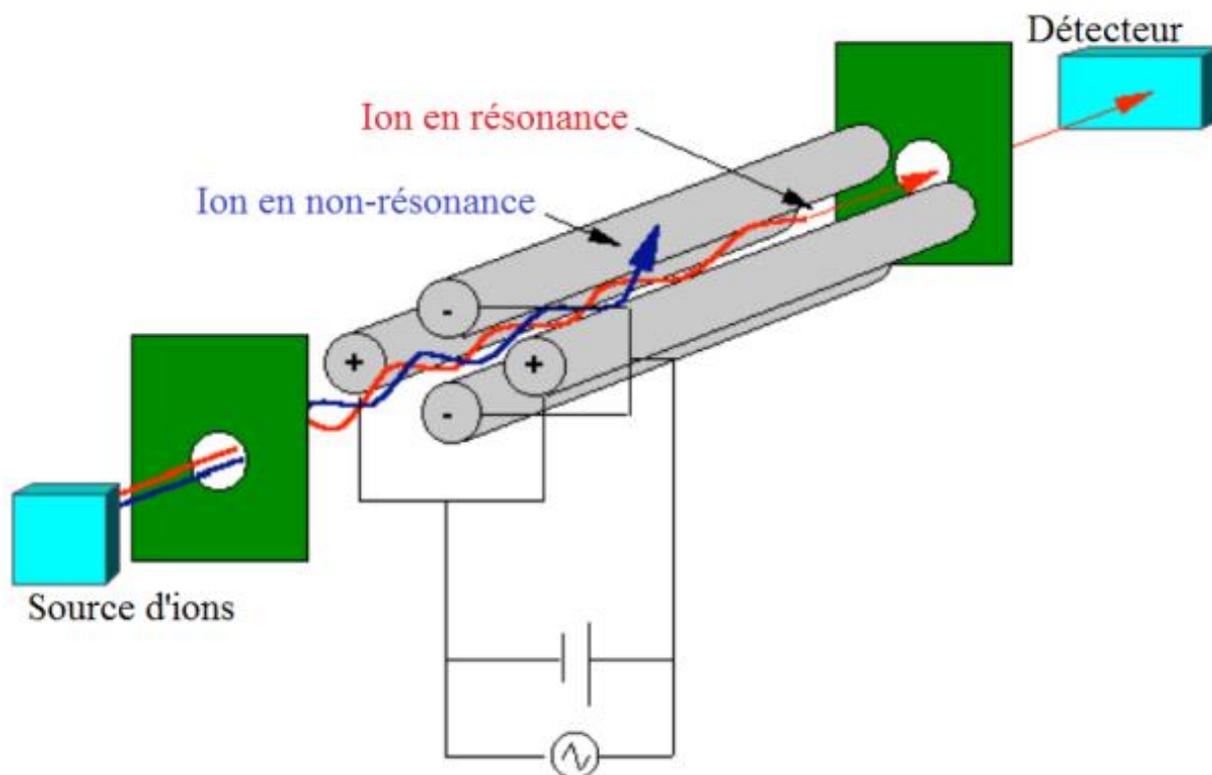
Il existe plusieurs systèmes MS/MS qui se caractérisent par le type d'analyseurs en masse employé. Ces analyseurs se distinguent notamment par leur capacité de résolution (**Figure 42**) et leur gamme dynamique, c'est-à-dire la linéarité entre la concentration en analytes et la réponse du détecteur.



**Figure 42** – Niveaux de résolution des spectres de masse.

Le triple quadripôle (QqQ), constitué de trois quadripôles en série, est le système MS/MS à basse résolution ( $R=2000$ ) le mieux adapté pour l'analyse quantitative des peptides car sa gamme dynamique est excellente et sa rapidité d'acquisition lui confère une très grande adaptabilité aux couplages chromatographiques. Un quadripôle se présente sous forme de quatre électrodes parallèles, reliées deux à deux électriquement, et soumises à des potentiels de même valeur mais de polarités contraires. Le potentiel appliqué aux ions provenant de la source d'ionisation comprend une composante continue et sinusoïdale, leur conférant une trajectoire oscillante entre les quatre électrodes. À un potentiel donné, seuls les ions dont le rapport  $m/z$  permet une trajectoire stable (ions en résonance) atteignent le détecteur. Les autres ions dont l'amplitude est trop élevée, finissent par toucher le quadripôle sur lequel ils se déchargent (ions en non-résonance), empêchant toute détection (**Figure 43**) (Werner, 2011; Yates, 1998). En d'autres termes, le quadripôle est majoritairement utilisé comme filtre à ion, ce qui le rend parfaitement adapté (sensible et spécifique) aux analyses quantitatives ciblées en dépit de sa faible résolution ( $\pm 0,5$  unité de masse atomique). En mode MS/MS, le premier quadripôle permet de sélectionner l'ion précurseur pour le fragmenter dans la chambre de collision (second

quadripôle). Le ou les ions fragments majoritaires sont ensuite sélectionnés par le troisième quadripôle. La sélection d'une transition « ions précurseurs → ions fragments » (mode MRM ou « Multiple Reaction Monitoring ») est hautement sélective malgré la basse résolution du QqQ et confère à ce système une très haute sensibilité.



**Figure 43** – Fonctionnement du quadripôle (extrait de [Werner, 2011](#)).

D'autres analyseurs en masse de très haute résolution, comme l'Orbitrap<sup>®</sup>, permettent aussi une bonne analyse des peptides même si leur gamme dynamique et leur sensibilité sont généralement moins bonnes que celles du quadripôle. L'Orbitrap<sup>®</sup> est un piège à ions composé d'une électrode creuse externe et d'une électrode coaxiale interne autour de laquelle les ions, propulsés de manière tangentielle, se mettent en orbite à une fréquence dépendante de leur rapport  $m/z$  ([Hu et al., 2005](#)). En mode MS/MS, l'Orbitrap<sup>®</sup> est souvent couplé à d'autres analyseurs en masse de basse résolution comme le quadripôle, utilisé pour isoler l'ion précurseur à la sortie de la source d'ionisation. Cet ion est ensuite fragmenté dans la cellule de collision puis ses fragments sont accumulés dans la C-trap, avant d'être injectés et analysés dans l'Orbitrap<sup>®</sup> (**Figure 44**) ([Hu et al., 2005](#)).

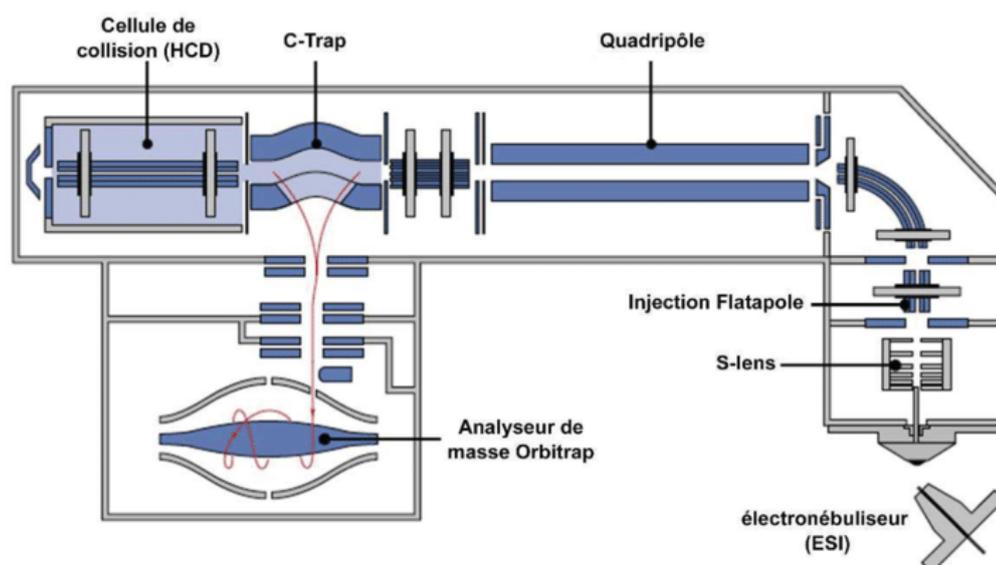


Figure 44 – Fonctionnement du Q-Orbitrap® (extrait de <http://thermofisher.com>).

**Analyse quantitative et polymorphique des apolipoprotéines** – La quantification des apolipoprotéines par LC-MS/MS est possible *via* des solutions étalons de peptides synthétiques ou de protéines recombinantes (idéalement) de concentrations connues. Afin de corriger les éventuelles erreurs expérimentales lors de la préparation des échantillons il est nécessaire d'ajouter de manière équivalente à tous les échantillons, un ou plusieurs standard(s) interne(s) dès les premières étapes du protocole. Dans le cadre de l'analyse des protéines, les standards internes sont généralement des peptides exogènes enrichis en azote 15 ( $^{15}\text{N}$ ) ou en carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) et ayant la même séquence et les mêmes propriétés physico-chimiques que le peptide signature endogène choisi. Puisque le standard interne possède une masse moléculaire différente de son homologue endogène, il peut être analysé de manière spécifique par le spectromètre de masse selon son rapport  $m/z$ . Ainsi, le signal obtenu pour le standard interne permet de normaliser celui obtenu pour le peptide signature (Croyal et al., 2016; Percy et al., 2014). Le choix du peptide signature est également primordial puisqu'il doit être stable (oxydation des cystéines alkylées et des méthionines), contenir suffisamment d'acides aminés pour être protéotypique de la protéine ciblée, et présenter le plus d'avantages analytiques possibles (ionisation, solubilité). Par ailleurs, il est nécessaire de connaître le nombre de répétitions de ce peptide dans la séquence de la protéine pour pouvoir utiliser les règles élémentaires de stœchiométrie pour déterminer la concentration molaire de la protéine (Croyal, 2017). Concernant l'analyse de l'apo(a), la LC-MS/MS permet de la quantifier en utilisant des peptides signatures situés dans des régions non répétées de sa séquence. À l'instar de la PCR, cette approche peut aussi donner une indication partielle de la taille de l'apo(a) en utilisant un

peptide signature situé dans la région KIV<sub>2</sub> (Croyal et al., 2015). Malheureusement, comme la plupart des individus sont hétérozygotes, la valeur de KIV déterminée est une moyenne de la taille des deux isoformes d'apo(a) circulantes pondérée par l'expression des deux isoformes en présence. Ainsi, pour un individu exprimant de manière équivalente une isoforme à 20 KIV et une autre à 30 KIV, la valeur obtenue par LC-MS/MS sera égale à 25 (Croyal et al., 2015).

La LC-MS/MS présente de nombreux avantages car c'est une technique rapide qui permet la quantification simultanée de plusieurs protéines tout en identifiant certaines mutations polymorphiques connues comme les mutations majoritaires de l'apoE (Martínez-Morillo et al., 2014). De plus, la qualité de l'analyse des protéines par LC-MS/MS est moins influencée par la détérioration des échantillons plasmatiques que les méthodes immuno-chimiques. Cependant, contrairement à celles-ci, la LC-MS/MS ne permet pas de quantifier de manière fiable des protéines à des concentrations trop basses (< 10 nmol/L). Dans ce cas, il est nécessaire d'avoir recours à des étapes préalables de concentration des protéines. Comme les techniques immuno-chimiques, la LC-MS/MS souffre d'une variabilité de mesure importante entre les laboratoires et les différents systèmes de spectromètre de masse, résultant principalement d'un manque de protocoles standardisés (van den Broek et al., 2016).

#### 4.3.3. Flux métabolomiques et isotopes stables

Outre l'analyse quantitative des apolipoprotéines et l'identification de mutations au niveau de la séquence polypeptidique, la LC-MS/MS permet également d'explorer les flux métabolomiques des apolipoprotéines *via* des études cinétiques impliquant des traceurs enrichis par des isotopes stables. Cette méthode consiste à mesurer au cours du temps l'incorporation d'un précurseur de synthèse comme la <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine au sein des protéines endogènes. La modélisation mathématique des courbes cinétiques générées permet ensuite d'évaluer leurs vitesses de production et de dégradation (Barrett et al., 2006). En pratique, la <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine est injectée à l'état stationnaire (à jeun) par voie intraveineuse, soit de manière constante pendant toute la durée du protocole, soit sous forme d'un bolus unique à forte dose. Le sang est alors prélevé à intervalles réguliers pendant plusieurs heures (de 12 à 96 heures suivant les protocoles), puis centrifugé pour récupérer le plasma. Comme pour l'analyse quantitative des protéines, les échantillons de plasma peuvent subir des étapes préalables pour isoler les différentes classes de lipoprotéines avant leur digestion enzymatique. Le choix du peptide signature est primordial puisqu'il doit logiquement contenir l'acide aminé traceur, en l'occurrence la leucine. Le peptide enrichi (traceur) contenant la <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine est alors analysé simultanément au peptide naturel (tracé) non

enrichi afin de mesurer les enrichissements *via* le ratio traceur/tracé au cours du temps, et de générer des courbes cinétiques. Ces courbes sont ensuite modélisées mathématiquement pour déterminer le taux de catabolisme fractionné et le taux de production absolu (Barrett et al., 2006). Le taux de catabolisme fractionné obtenu par modélisation correspond à la proportion en masse d'une protéine qui est renouvelée par unité de temps (pool/jour) alors que le taux de production de la protéine d'intérêt correspond à la quantité de pool renouvelée par unité de temps (g/kg/jour) et se calcule par le produit du taux de catabolisme avec la taille du pool (g/L) et le volume de sang par kilogramme de poids corporel (~0,045 L/kg) (Croyal, 2017).

#### 4.4. Détermination du nombre de KIV

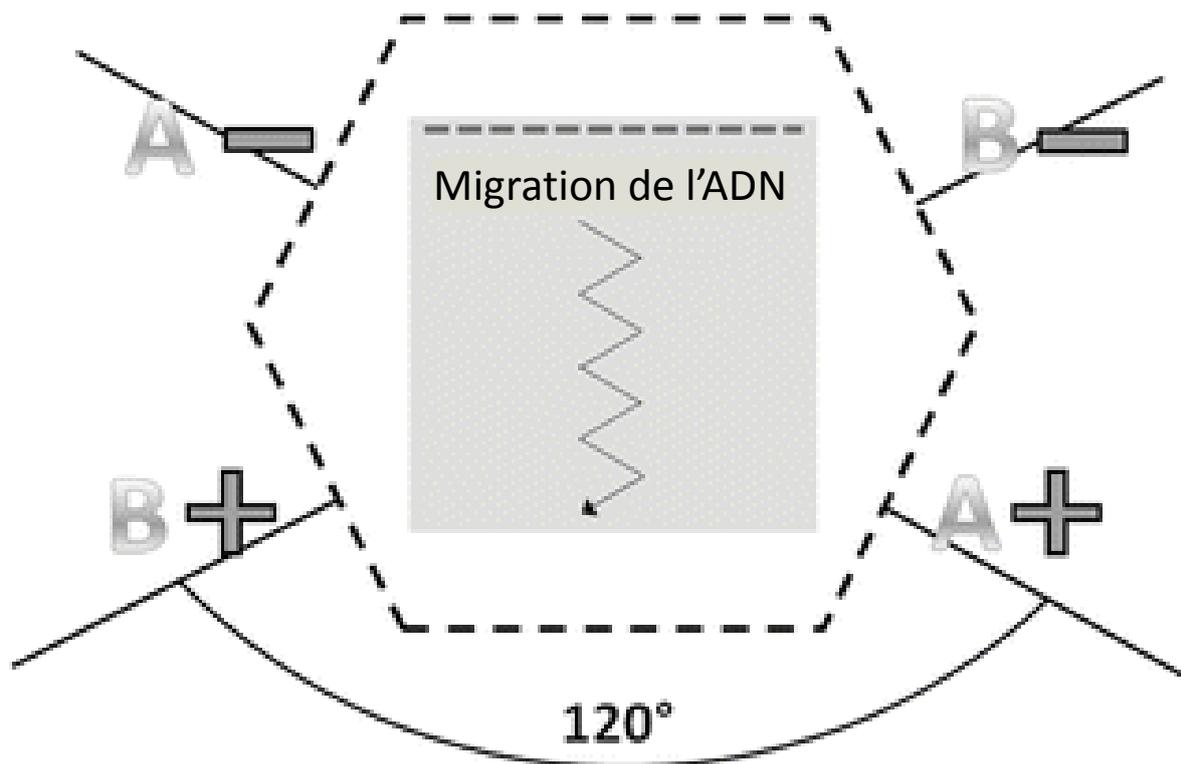
Au-delà du séquençage d'ADN pour l'identification de SNP régulateurs des niveaux de Lp(a), l'étude rigoureuse de cette lipoprotéine passe par la détermination du nombre de KIV de l'apo(a). En effet, sa taille explique jusqu'à 70% des niveaux de Lp(a), c'est pourquoi cette donnée peut difficilement être négligée (Coassin et al., 2017). Malheureusement, les méthodes disponibles à ce jour ne sont pas nombreuses.

##### 4.4.1. Le Western Blot

La taille de l'apo(a) peut être déterminée dans le sérum ou dans le plasma par Western Blot en réalisant une électrophorèse sur gel d'agarose en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). Cette technique a pour avantage de ne détecter que les isoformes réellement exprimées. Bien que 95% des individus soient hétérozygotes, seulement 50 à 70% d'entre eux présentent deux isoformes circulantes détectables. Dans les 30 à 50% des individus restants, très peu sont génétiquement homozygotes ; la plupart étant hétérozygotes mais le niveau d'expression d'une des deux isoformes ne permet pas de la visualiser par Western Blot. De plus, cette technique est difficile à réaliser et ne peut déterminer le nombre exact de KIV qu'avec une précision de un à deux KIV (Kronenberg, 2019). Jusqu'à aujourd'hui, le Western Blot est cependant la méthode de référence pour l'étude du polymorphisme de taille de l'apo(a) et du risque cardiovasculaire associé, mais cette technique n'est disponible que dans quelques laboratoires spécialisés dans le monde.

#### 4.4.2. Les approches génétiques

Il existe deux grandes méthodes pour étudier le nombre de KIV au niveau de la séquence d'ADN. La première, l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE), est une technique difficile à réaliser qui nécessite une préparation minutieuse de l'ADN génomique en générant grâce à *KpnI*, une enzyme de restriction, des fragments d'ADN de haut poids moléculaire contenant les domaines *KIV-2* intacts du gène *LPA* (Lackner et al., 1991). Comme ces fragments d'ADN sont trop longs (> 50 kilo-bases) pour pouvoir être séparés selon leur taille par simple migration (Southern Blot), il est nécessaire de procéder à une électrophorèse sur gel en champ pulsé. Cette technique consiste à appliquer un champ électrique en modifiant périodiquement sa direction. Dans ces conditions, le temps mis par la molécule d'ADN pour se positionner dépend de sa longueur. Ainsi, une molécule d'ADN très longue (2 000 kilo-bases) passera plus de temps à se réorienter qu'à se déplacer, tandis qu'une plus petite molécule (200 kilo-bases) passera plus de temps à migrer (**Figure 45**) (Mawer and Leach, 2013).



**Figure 45** – Principe de l'électrophorèse de gel en champ pulsé (extrait de Mawer and Leach, 2013).

Les fragments des allèles de *LPA* de tailles différentes sont alors séparés puis détectés par hybridation *in situ* en fluorescence à l'aide d'une sonde ciblant spécifiquement la partie *KIV-2* (Kraft et al., 1992a).

Contrairement à l'électrophorèse de gel en champ pulsé, la réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) est réalisable à haut débit mais ne permet d'obtenir que la somme du nombre de copies *KIV-2* des deux allèles du gène *LPA* (Kamstrup et al., 2009). Ainsi, cette technique ne permet pas de distinguer un individu ayant un allèle court et un long d'un individu porteur de deux allèles de taille moyenne.

Cependant, la détermination du nombre de *KIV-2* par l'analyse d'ADN n'est pas pertinente car, quelle que soit la taille de l'apo(a), c'est son expression dans la circulation qui permet d'évaluer le risque cardiovasculaire associé. C'est pourquoi, d'un point de vue clinique, l'étude d'une isoforme d'apo(a) non exprimée n'a aucune valeur diagnostic. Par ailleurs, beaucoup de spécialistes proposent de ne considérer que les concentrations plasmatiques de Lp(a), indépendamment de la taille d'apo(a), pour prédire le risque cardiovasculaire (Kronenberg, 2019). Une étude récente suggère malgré tout un effet causal des petites isoformes d'apo(a) sur l'augmentation du risque athérosclérotique (Saleheen et al., 2017), mais les données manquent pour le confirmer avec certitude.

Très peu de laboratoires dans le monde possèdent tous les équipements et les savoir-faire requis pour mettre en place ces techniques, c'est pourquoi la Lp(a) est plus difficile à étudier que les autres lipoprotéines. Malgré quelques grands spécialistes investiguant la Lp(a) depuis les années 1990, cette lipoprotéine reste énigmatique et suscite toujours autant de débats lors des grandes conférences internationales en cardiologie.

# **OBJECTIFS DE LA THESE**



**Contexte** – Presque 60 ans après sa découverte, l'intérêt pour la Lp(a) émerge à nouveau et fait l'objet de nombreuses études fondamentales, translationnelles et cliniques. Aujourd'hui, des taux élevés de Lp(a) constituent incontestablement un des plus importants facteurs de risque transmissibles, indépendants et causaux pour la survenue d'une maladie cardiovasculaire ou de sténose de la valve aortique chez l'Homme. Néanmoins, les particularités biochimiques et biologiques de la Lp(a) font de cette lipoprotéine un sujet de recherche à la fois fascinant et très complexe. En effet, très peu de laboratoires possèdent les techniques nécessaires pour l'étudier convenablement et les méthodes de dosages disponibles présentent encore aujourd'hui une grande hétérogénéité de réponse, en particulier à cause du polymorphisme de taille de sa protéine signature, l'apo(a). Par ailleurs, son métabolisme est faiblement associé à celui des autres lipoprotéines et ses concentrations plasmatiques sont peu influencées par la plupart des traitements hypolipémiants, l'alimentation, l'exercice physique, l'âge, le sexe ou d'autres facteurs environnementaux. C'est au niveau génétique que les concentrations de Lp(a) sont principalement régulées. Le polymorphisme du gène *LPA* peut expliquer à lui seul jusqu'à 90% des concentrations circulantes en Lp(a) et les polymorphismes des gènes *APOE* et *PCSK9* sont les seuls autres facteurs génétiques qui semblent avoir une influence notable sur ses concentrations. Enfin, les mécanismes de synthèse et d'assemblage de la Lp(a) restent encore à déterminer et ses voies d'épuration ne sont toujours pas connues et font l'objet de controverses, notamment en ce qui concerne l'influence du LDLR.

**Premier objectif** – La mise en place d'approches méthodologiques fiables pour l'étude de la Lp(a) est primordiale. Premièrement, la détermination du nombre de KIV sur l'apo(a) plasmatique par Western Blot est incontournable puisque ce polymorphisme de taille contrôle entre 40 et 70% des taux de Lp(a). Par ailleurs, la LC-MS/MS apparaît de plus en plus comme une alternative robuste aux méthodes immuno-chimiques et à la grande variabilité des mesures qu'elles génèrent. En effet, la LC-MS/MS permet d'obtenir en une seule injection, et à l'aide d'une seule préparation d'échantillon, les concentrations molaires et les mutations d'acides aminés de multiples protéines plasmatiques comme l'apo(a), l'apoB100 et l'apoE. Outre l'approche statique, la LC-MS/MS offre la possibilité d'analyser de manière dynamique les flux métaboliques des lipoprotéines et de leurs apolipoprotéines, en utilisant des traceurs enrichis en isotopes stables. Le **premier objectif de cette thèse était donc de mettre en place une méthode LC-MS/MS pour l'étude statique et dynamique de l'apo(a) et d'autres apolipoprotéines potentiellement associées à la Lp(a) comme l'apoE**. La mise au point d'une

**technique biochimique complexe par Western Blot pour la détermination de la taille de l'apo(a)** était également nécessaire pour la suite des travaux de recherche.

**Deuxième objectif** – Le polymorphisme de l'apoE influence significativement les concentrations plasmatiques de la Lp(a) mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus. L'apoE est un ligand du LDLR et est particulièrement impliquée dans le renouvellement des lipoprotéines riches en triglycérides. Ses isoformes majoritaires  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$  présentent par ailleurs une affinité différente pour le LDLR. Dès lors, le **deuxième objectif de cette thèse était d'investiguer le lien entre l'apoE et la Lp(a) dans différentes dyslipidémies impliquant notamment le LDLR et les lipoprotéines riches en triglycérides**. Pour cela, nous avons employé des approches cinétiques et statiques chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, de dysbêtalipoprotéïnémie, d'hypertriglycéridémie et porteurs de mutations GOF ou LOF de *PCSK9*.

**Troisième objectif** – Actuellement, la stratégie médicale la plus répandue pour la prise en charge des patients avec des niveaux élevés de Lp(a) consiste à traiter tous les autres facteurs de risque, en particulier le LDL cholestérol, à l'aide de statines. Les statines n'ayant pas d'effet sur les niveaux de Lp(a), ces patients présentent généralement un risque résiduel très élevé même lorsque leurs taux de LDL cholestérol atteignent des niveaux très bas voire inférieurs à 70 mg/dL. De nouveaux traitements basés sur la thérapie anti-sens ciblant spécifiquement la production d'apo(a) sont en cours de développement. En attendant les résultats des premiers essais cliniques de phase III, les alternatives efficaces pour réduire la Lp(a) manquent. La niacine diminue les niveaux de Lp(a) mais son utilisation a été stoppée car aucun bénéfice cardiovasculaire n'a été observé avec ce traitement. Aujourd'hui, les inhibiteurs de PCSK9 et l'aphérèse sont les seules thérapies efficaces et disponibles pour diminuer les taux de Lp(a). **Le troisième objectif de cette thèse était donc d'étudier l'effet de ces deux traitements et les mécanismes par lesquels ils réduisent la Lp(a)**.

# **TRAVAUX PERSONNELS**



# Article 1

## **A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins**

**Blanchard V\***, Garçon D, Jaunet C, Chemello K, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Garfa A, Famchon G, Torres A, Le May C, Pichelin M, Bigot-Corbel E, Lambert G, Cariou B, Hadjadj S, Krempf M, Bach-Ngohou K and Croyal M\*.

\*Corresponding authors

*J Lipid Res.* **2018** May. DOI: 10.1194/jlr.D120000835

### Résumé

Les apolipoprotéines contrôlent le métabolisme lipoprotéique en assurant de nombreuses fonctions comme l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines, leur interaction avec des récepteurs cellulaires ou encore l'activation ou l'inhibition d'enzymes clés du métabolisme ([Dominiczak and Caslake, 2011](#)). Des variations de concentrations et/ou certains polymorphismes des apolipoprotéines peuvent être associées à de nombreuses dyslipidémies. Les apolipoprotéines constituent donc des biomarqueurs pertinents du métabolisme lipidique et leur analyse est essentielle dans l'évaluation du risque cardiovasculaire associé à ces pathologies. La LC-MS/MS permet d'obtenir un profil métabolique précis pour chaque patient en analysant plusieurs apolipoprotéines simultanément à partir d'un petit volume d'échantillon et en un temps relativement court. Les protocoles de préparation des échantillons impliquent l'analyse de peptides générés après une étape de protéolyse enzymatique, associée généralement à des étapes de lavage pour isoler les peptides d'intérêt des composés indésirables présents dans l'échantillon biologique (plasma, sérum, lipoprotéines...). Cependant, les mesures par LC-MS/MS font l'objet d'une grande variabilité entre les laboratoires à cause d'un manque d'harmonisation des protocoles expérimentaux.

Nous avons donc mis au point une méthode LC-MS/MS multiplexée, impliquant un kit commercial pour la préparation des échantillons et un système de spectrométrie de masse

courant de type « triple quadripôle », capable de quantifier rapidement, spécifiquement et simultanément 18 espèces d'apolipoprotéines humaines, d'évaluer la taille de l'apo(a) et de déterminer des mutations de l'apoE et de l'apoL1. Toutes les étapes expérimentales ont été optimisées et validées dans le respect des normes standards établies pour la validation des méthodes analytiques. Le plasma et le sérum de 160 individus sains (80 femmes et 80 hommes) ont été utilisés afin (1) d'optimiser le protocole de préparation des échantillons pour la digestion tryptique, (2) de tester la fiabilité analytique de la méthode LC-MS/MS pour chaque apolipoprotéine, (3) de comparer les résultats LC-MS/MS avec ceux obtenus par d'autres méthodes incluant les méthodes conventionnelles immuno-chimiques et la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS), et (4) de tester la stabilité des peptides signatures et des plasma/sérum dans le temps. En parallèle, nous avons développé la méthode pour la détermination du nombre exact de KIV de l'apo(a) plasmatique par Western Blot, que nous avons comparée à la LC-MS/MS.

Ces travaux ont permis de proposer une méthode extrêmement fiable pour le criblage des apolipoprotéines à l'échelle de cohorte, et constituent aujourd'hui notre outil de base dans nos travaux de recherche.



## methods

# A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins<sup>§</sup>

Valentin Blanchard,<sup>1,\*</sup> Damien Garçon,<sup>†</sup> Catherine Jaunet,<sup>§</sup> Kevin Chemello,<sup>\*</sup> Stéphanie Billon-Crossouard,<sup>\*\*††</sup> Audrey Aguesse,<sup>\*\*††</sup> Aya Garfa,<sup>††</sup> Gilles Famchon,<sup>§</sup> Amada Torres,<sup>\*\*</sup> Cédric Le May,<sup>†</sup> Matthieu Pichelin,<sup>§§</sup> Edith Bigot-Corbel,<sup>§</sup> Gilles Lambert,<sup>\*</sup> Bertrand Cariou,<sup>§§</sup> Samy Hadjadj,<sup>††,§§</sup> Michel Krempf,<sup>\*\*††,\*\*\*</sup> Kalyane Bach-Ngohou,<sup>§,†††</sup> and Mikael Croyal<sup>1,\*\*††</sup>

Université de La Réunion,<sup>\*</sup> INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DéTROI), Plateforme CYROI, Saint-Denis de La Réunion, France; L'Institut du Thorax,<sup>†</sup> INSERM, CNRS, University of Nantes, Nantes, France; Department of Biochemistry,<sup>§</sup> CHU de Nantes, Nantes, France; NUN,<sup>\*\*</sup> INRA, CHU Nantes, UMR 1280, PhAN, IMAD, CRNH-O, Nantes, France; CRNH-O Mass Spectrometry Core Facility,<sup>††</sup> Nantes, France; L'Institut du Thorax,<sup>§§</sup> INSERM, CNRS, University of Nantes, CHU Nantes, Nantes, France; ELSAN,<sup>\*\*\*</sup> Clinique Bretéché, Nantes, France; and INSERM U1235,<sup>††</sup> University of Nantes, Nantes, France

ORCID ID: 0000-0002-5449-5817 (M.C.)

**Abstract** Apolipoproteins govern lipoprotein metabolism and are promising biomarkers of metabolic and cardiovascular diseases. Unlike immunoassays, MS enables the quantification and phenotyping of multiple apolipoproteins. Hence, here, we aimed to develop a LC-MS/MS assay that can simultaneously quantitate 18 human apolipoproteins [A-I, A-II, A-IV, A-V, B48, B100, C-I, C-II, C-III, C-IV, D, E, F, H, J, LI, M, and (a)] and determined apoE, apoL1, and apo(a) phenotypes in human plasma and serum samples. The plasma and serum apolipoproteins were trypsin digested through an optimized procedure and peptides were extracted and analyzed by LC-MS/MS. The method was validated according to standard guidelines in samples spiked with known peptide amounts. The LC-MS/MS results were compared with those obtained with other techniques, and reproducibility, dilution effects, and stabilities were also assessed. Peptide markers were successfully selected for targeted apolipoprotein quantification and phenotyping. After optimization, the assay was validated for linearity, lower limits of quantification, accuracy (biases: -14.8% to 12.1%), intra-assay variability [coefficients of variation (CVs): 1.5–14.2%], and inter-assay repeatability (CVs: 4.1–14.3%). Bland-Altman plots indicated no major statistically significant differences between LC-MS/MS and other techniques. The LC-MS/MS results were reproducible over five repeated experiments (CVs: 1.8–13.7%), and we identified marked differences among the plasma and serum samples. **§** The LC-MS/MS assay developed here is rapid,

requires only small sampling volumes, and incurs reasonable costs, thus making it amenable for a wide range of studies of apolipoprotein metabolism. We also highlight how this assay can be implemented in laboratories.—Blanchard, V., D. Garçon, C. Jaunet, K. Chemello, S. Billon-Crossouard, A. Aguesse, A. Garfa, G. Famchon, A. Torres, C. Le May, M. Pichelin, E. Bigot-Corbel, G. Lambert, B. Cariou, S. Hadjadj, M. Krempf, K. Bach-Ngohou, and M. Croyal. **A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins.** *J. Lipid Res.* 2020. 61: 1128–1139.

**Supplementary key words** proteomics • lipoprotein metabolism • metabolic disease • assay development • isotopic labeling • lipid metabolism • plasma lipid • serum lipid

Apolipoproteins govern lipoprotein regulation and metabolism. They constitute a family of multifunctional proteins that structure lipoprotein particles and direct their metabolism through binding to cell-surface receptors and regulation of enzyme activities (1, 2). As apolipoproteins are involved in pro- and anti-atherosclerotic processes, they are important circulating biomarkers of metabolic dysfunction and atherosclerotic CVD (1, 3, 4).

The primary clinical application of plasma apolipoprotein measurements is the early detection of metabolic

This work was supported by grants from the Fondation de France and by the French national Cholesterol Personalized Innovation (CHOPIN) project, funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007) and coordinated by the Centre Hospitalo-Universitaire of Nantes. V.B. received scholarships from the Région Réunion and the European Union (European Regional Development Fund INTERREG V). Additional financial support was provided by the Biogénest Corsaire core facility. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Manuscript received 14 April 2020 and in revised form 8 May 2020.

Published, JLR Papers in Press, May 13, 2020  
DOI <https://doi.org/10.1194/jlr.D120000835>

Abbreviations: CV, coefficient of variation; IS, internal standard; LC-HRMS, LC-high-resolution MS; LOQ, limit of quantification; QC, quality control; SPE, solid-phase extraction; TFA, trifluoroacetic acid.

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

e-mail: mikael.croyal@univ-nantes.fr (M.C.);

valentin.blanchard@univ-reunion.fr (V.B.)

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

Copyright © 2020 Blanchard et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.  
This article is available online at <https://www.jlr.org>

diseases leading to CVD (3–5). Plasma concentrations of apoB100 and apoA-I have been reported to predict the risk of CVD better than those of LDL-C and HDL-C (1, 3, 4). ApoC-III and lipoprotein (a) [Lp(a)] are also considered as powerful CVD risk factors (6, 7). Additionally, postprandial metabolism is important in atherogenesis, particularly in the context of obesity, insulin resistance, and diabetes. ApoB48, apoCs, and apoE have become predominant markers of CVD-related risk in this emerging field (4, 8). Furthermore, the phenotyping of the major apoE isoforms and other apolipoproteins or apolipoprotein-like proteins (1, 2, 4, 5, 9) is used to diagnose mixed dyslipidemias (10–12).

Immunoassays used for apolipoprotein quantification are associated with many drawbacks, and their standardization is limited to the major apolipoproteins (3, 4). In contrast, MS enables the analysis of multiple proteins from a small sample volume at a high throughput rate. Protocols usually involve the analysis of protein mixtures after enzymatic proteolysis, which are then analyzed by LC-MS/MS, often in combination with upstream cleaning methods to reduce sample complexity (13). Thus, LC-MS/MS allows a high level of multiplexing, enabling simultaneous quantification of several proteins (14–16) and providing further information on a patient's metabolic profile by targeting specific polymorphisms that cannot be detected by immunoassays (3, 12, 16, 17).

However, LC-MS/MS suffers from nonnegligible between-laboratory variability stemming from the lack of harmonized protocols (3). Here, we describe a multiplexed LC-MS/MS method that can simultaneously quantitate 18 human apolipoprotein species and determine pathogenic variants resulting from CVD-associated SNPs. Each experimental step was developed, optimized, and validated in agreement with standard procedures for analytical method validations (<https://clsi.org/>) (18, 19), and major pitfalls were highlighted.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental design and rationale

The present multiplex LC-MS/MS assay has been developed and validated according to the Tier 2 level of guidelines for Development and Application of Targeted Mass Spectrometry Measurements of Peptides and Proteins (20). All required information relative to the guidelines is described below. The assay was validated on 160 healthy human and patient samples without any specific inclusion or exclusion criteria to get a broad range of lipid phenotypes.

### Selection of peptide markers

Apolipoprotein sequences were BLAST searched using the UNIPROT tool ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), and theoretical peptides were searched using ExpASY ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass](http://web.expasy.org/peptide_mass)). Peptide candidates were selected *in silico* to maximize the sensitivity, specificity, and stability (21). Each candidate was then experimentally sought and characterized by LC-high-resolution (HR) MS (LC-HRMS) from concentrated lipoprotein fractions after trypsin digestion (21). The most specific and detectable peptides were selected for assay sensitivity optimization.

### Biological samples

Human EDTA plasma samples (80 males, 80 females; nonfasted; supplemental Table S1) and paired samples of serum ( $n = 160$ ), Li-heparin ( $n = 72$ ), and citrate plasma ( $n = 54$ ) were provided by the French Blood Bank (Nantes, France). Samples were immediately dispatched in single-use aliquots (40  $\mu$ l) and the first LC-MS/MS assay in individuals was performed within the 14 days after collection and after a single freeze/thaw cycle. Pooled samples were prepared for each matrix by mixing equal fractions from each individual sample. Ethics approval for sample collection was acquired from the institutional review board of Nantes University Hospital, and written informed consent was obtained from each subject. All studies were designed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Pooled bovine EDTA plasma (six males, six females) was purchased from Patricell Ltd. (Nottingham, UK) and used as a surrogate matrix for method validation, as bovine apolipoprotein sequences are distinct from those of humans. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### Standard samples and quality controls

Synthetic labeled and unlabeled proteotypic peptides were provided by Thermo Scientific Biopolymers (Darmstadt, Germany). Stock solutions (1 mM) were prepared in 50% acetonitrile containing 0.1% formic acid and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. A mixed solution of unlabeled peptides was constituted and serially diluted in water to obtain seven standard solutions (Table 1). Quality control (QC) samples were prepared at three concentration levels, including lower and upper limits of quantification (LOQs). Concentrated solutions were prepared in water and then diluted 10-fold in bovine EDTA plasma (QC samples) or in water (control samples) (Table 1). Labeled peptides (i.e., containing [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ ] K, [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ ] R, or [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}$ ] I in the C-terminal position) were used as internal standards (ISs). A mixed solution of ISs (35  $\mu$ M) was prepared and added to digestion buffer (ammonium bicarbonate, 50 mM) to a final concentration of 1.75  $\mu$ M.

### General procedure for sample preparation

Samples were prepared with the ProteinWorks™ eXpress kit (Waters, Milford, MA), according to the manufacturer's instructions (supplemental Table S2). Samples (40  $\mu$ l) were incubated for 10 min at  $80^{\circ}\text{C}$  in digestion buffer containing ISs (100  $\mu$ l) and RapidGest detergent solution (7 mg/ml, 10  $\mu$ l), reduced for 20 min at  $60^{\circ}\text{C}$  with dithiothreitol (70 mM, 20  $\mu$ l), alkylated for 30 min at room temperature in the dark with iodoacetamide (142 mM, 30  $\mu$ l), and digested overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\sim 16$  h) with trypsin (7 mg/ml, 30  $\mu$ l). Enzymatic digestion was stopped with 20% trifluoroacetic acid (TFA; 5  $\mu$ l). After 15 min at  $45^{\circ}\text{C}$ , the precipitate was removed by centrifugation (15 min,  $10^{\circ}\text{C}$ , 10,000  $g$ ), and supernatants were cleaned on 30 mg Oasis HLB cartridges (Waters), which were conditioned (100% methanol; 1 ml), equilibrated (100% water; 1 ml), loaded (sample;  $\sim 200$   $\mu$ l), washed (5% methanol; 1 ml), and eluted (80% methanol; 500  $\mu$ l). The eluates were dried under nitrogen ( $45^{\circ}\text{C}$ ), reconstituted with 5% acetonitrile containing 0.1% formic acid (100  $\mu$ l), and injected (10  $\mu$ l) into the LC-MS/MS system. Analyses were performed on a Xevo™ TQD mass spectrometer with an electrospray interface and an Acquity H-Class™ UPLC™ device (Waters). The optimized LC-MS/MS and "multiple reaction monitoring" parameters are detailed in supplemental Tables S3 and S4.

### Data management

Apolipoprotein concentrations were calculated using calibration curves plotted from standard solutions and expressed in micromoles, assuming that 1 mol of peptide was equivalent to 1 mol of protein. The concentrations were then converted to standard units (milligrams per deciliter) using the molecular masses

TABLE 1. Proteotypic peptides used for apolipoprotein quantification

Protein	Molecular Mass (kDa)	Proteotypic Peptide	Concentration Range (μM)	LQC (μM)	MQC (μM)	HQC (μM)
ApoA-I	28.1	ATEHLSTLSEK	1–100	1	25	100
ApoA-II	9.3	SPELQAEAK	0.5–50	0.5	10	50
ApoA-IV	43.4	SELTQQLNALFQDK	0.5–50	0.5	10	50
ApoA-V	38.9	VQELQEQLR	0.01–1	0.01	0.25	1
ApoB48	240.8	LSQLQTYMI	0.01–1	0.01	0.25	1
ApoB100	512.9	ATGVLYDYVVK	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoC-I	6.6	TPDVSSALDK	0.05–5	0.05	1	5
ApoC-II	8.2	TAAQNLYEK	0.25–25	0.25	5	25
ApoC-III	8.8	GWVTDGFSSLK	0.25–25	0.25	5	25
ApoC-IV	11.5	ELLETVVNR	0.05–5	0.05	1	5
ApoD	19.3	VLNQELR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE	34.2	LGPLVEQGR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE2	34.2	CLAVYQAGAR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE4	34.2	LGADMEDVR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE2/E3	34.2	LGADMEDVCGR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE3/E4	34.2	LAVYQAGAR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoF	17.4	SGVQQLIQYYQDQK	0.05–5	0.05	1	5
ApoH	36.3	ATVVYQGER	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoJ	50.1	ELDESLOVAER	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoL1	41.1	VAQELEEK	0.05–5	0.05	1	5
ApoL1 (G0)	41.1	LNILNNNYK	0.05–5	0.05	1	5
ApoL1 (G1)	41.1	LNMLNNNYK	0.05–5	0.05	1	5
ApoL1 (G2)	41.1	LNILNNK	0.05–5	0.05	1	5
ApoM	21.3	AFLITPR	0.1–10	0.1	2.5	10
Apo(a)	240–800	LFLEPTQADIALLK	0.005–0.5	0.005	0.1	0.5
Apo(a) Kr-IV <sub>2</sub>	12.5	GTYSTTIVTGR	0.25–25	0.25	5	25

Molecular masses were adopted from UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (signal peptides excluded from the calculation). Kr-IV<sub>2</sub>, apo(a) kringle IV<sub>2</sub>; LQC, low-concentration QC; MQC, middle-concentration QC; HQC, high-concentration QC.

(Table 1). Unlike the apoB and apoL1 isoforms (22, 23) (Fig. 1), the apoE phenotypes and isoform concentrations (E2/E3/E4) were determined from different peptide combinations (supplemental material) (12, 24). The mean size of apo(a) was also estimated by LC-MS/MS from two proteotypic peptides (supplemental material) (25).

### Optimization of sample preparation

Solid-phase extraction (SPE) was optimized from QC samples treated as described above. The wash and elution conditions were optimized with increasing levels of methanol or acetonitrile in water, with or without additives (0.1% TFA or 0.5% NH<sub>4</sub>OH) and were added directly after sample loading (n = 8 per condition). Several acetonitrile/water mixtures containing 0.1% formic acid were tested for sample reconstitution after drying (n = 8 per condition). Sample volumes, incubation times, and temperatures were optimized using a pooled human EDTA plasma sample to improve proteolysis (n = 8 per condition). Control samples were used to assess recoveries, matrix effects, and peptide stabilities throughout the experiments.

### Method validation

The LC-MS/MS assay was validated via four independent experiments consisting of two calibration curves and 18 QCs (three concentration levels, n = 6). The assay linearity was illustrated by R<sup>2</sup> coefficients calculated from calibration curves by linear regression analysis (1/x weighting, origin excluded). The intra-assay and inter-assay imprecisions were expressed by the coefficients of variation (CVs) obtained at each QC level. The accuracy was expressed by the mean bias between the theoretical and measured concentrations at each QC level. Targeted lower LOQs were validated with signal-to-noise ratios greater than 10. Limits of acceptance were set at ±15% for accuracy and variability. To assess matrix effects and carry-over, the pooled human EDTA plasma was diluted in bovine EDTA plasma (1:0, 1:1, 1:3, and 1:7; v:v). Thirty replicates per dilution level were then trypsin digested,

randomized, and injected into the LC-MS/MS system. Matrix effects were determined by comparing individual measurements in EDTA plasma versus those in serum, Li-heparin plasma, and citrate plasma.

### Cross-validations

Individual EDTA plasma concentrations of apolipoproteins obtained by LC-MS/MS (n = 160) were compared with those obtained in a blinded fashion by standardized immuno-turbidimetry, sandwich ELISA, LC-HRMS, and Western blot (supplemental material). Three replicates of each QC sample and six replicates of the plasma pool were included in each LC-MS/MS experiment and randomly injected throughout the assay to ascertain the quality of our results as well as the proteolysis efficiency. Spearman correlations were calculated; and Bland-Altman plots were generated to compare our LC-MS/MS approach with the other methods (26).

### Statistical analyses

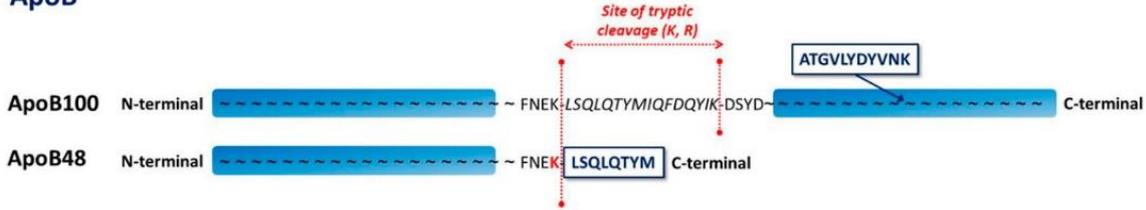
Graphics and analyses were achieved with GraphPad Prism software (version 6.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). The D'Agostino-Pearson test was used to estimate data distribution and select the most appropriate statistical test for data comparisons (significance at P < 0.05). Network analysis based on Spearman correlation analysis was also performed. The Spearman's rank correlation coefficient was computed (R software) and displayed using the "corrplot package."

## RESULTS

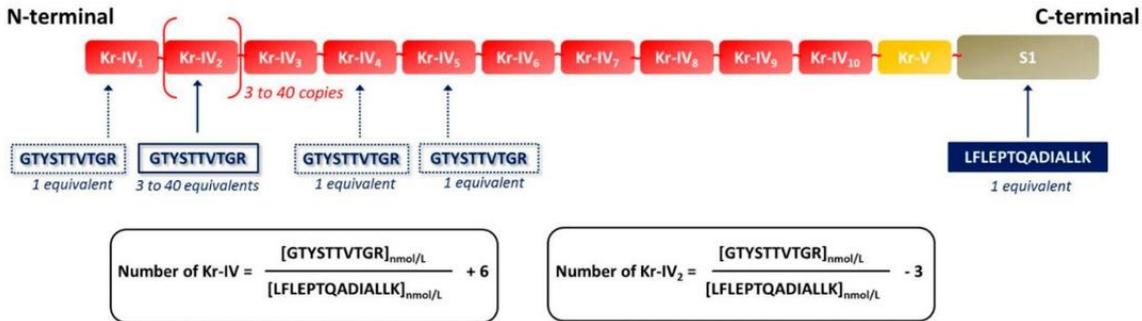
### Selection of peptide markers

In silico investigations led to the identification of numerous peptide candidates per target apolipoprotein.

**ApoB**



**Apo(a)**



**ApoE**

**ApoE3**

KVEQAVETEPEPELRQQTWEQSGQRWE  
 LALGRFDYLRWVQTLSQVQEELLSSQ  
 VTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTP  
 VAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDV  
GRLVQYRGEVQAMLGQSTELRVR LASH  
 LRKLRKRLRDADDLQK **R**LAVYQAGARE  
 GAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGS  
 LAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSR  
 TRDRLDEVKEQVAEVRKLEEQAAQQIRL  
 QAEAFQARLKSWFEP LVEDMQRQWAGL  
 VEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

Phenotype	E	E2	E4	E2/E3	E3/E4
ApoE2/E2	✓	✓	✗	✓	✗
ApoE3/E3	✓	✗	✗	✓	✓
ApoE4/E4	✓	✗	✓	✗	✓
ApoE2/E3	✓	✓	✗	✓	✓
ApoE2/E4	✓	✓	✓	✓	✓
ApoE3/E4	✓	✗	✓	✓	✓

- E LGPLVEQGR
- E2 CLAVYQAGAR
- E4 LGADMEDVR
- E2/E3 LGADMEDVCGR
- E3/E4 LAVYQAGAR

○ ApoE2: R → C  
 ○ ApoE4: C → R

**ApoL1**



Fig. 1. Selection of proteotypic peptides for apolipoprotein polymorphisms. A: Proteotypic peptides used to distinguish apoB48 and apoB100. B: Proteotypic peptides used to assess the mean polymorphic size of apo(a) [i.e., Kringle IV repeats (Kr-IV)]. C: Identification of apoE phenotypes by selective combinations of apoE proteotypic peptides. D: Identification of apoL1 isoforms by specific proteotypic peptides.

The most specific and detectable peptides were selected to optimize the assay sensitivity and specificity by LC-HRMS experiments (not shown). Peptide candidates were primarily

detected as doubly charged precursor ions, except for apoA-I (a triply charged ion). After MS/MS fragmentation, each precursor ion yielded several specific and singly

charged “y” or “b” product ions (except for apoA-I, doubly charged y ions), ascertaining thereby the peptide sequences (supplemental Fig. S1). The most intense and specific peptides were selected and synthesized for the manual optimization of the multiple reaction monitoring transitions used for LC-MS/MS analyses (supplemental Tables S4–S6).

#### Optimization of sample preparation

Trypsin proteolysis optimization showed contrasting digestion profiles between apolipoproteins (Fig. 2A). Unlike the manufacturer’s recommendations (2 h, 45°C), the optimal condition was reached with an overnight trypsin incubation at 37°C (Fig. 2B). All other recommendations were confirmed by testing four incubation times on the pooled human EDTA plasma (not shown). SPE was also optimized on bovine EDTA plasma spiked with known amounts of synthetic peptides (QC). Methanol was slightly more efficient than acetonitrile for peptide recovery, while acidic (TFA) and basic (NH<sub>4</sub>OH) additives did not improve extraction (Fig. 2C). The wash and elution solvents were 5% and 80% methanol, respectively. After drying, several mixtures were tested for sample reconstitution to obtain the optimal signal intensity (supplemental Fig. S2). The most optimal mixture was 5% acetonitrile containing 0.1% formic acid. Higher concentrations of acetonitrile led to peak distortions for some polar peptides. Despite SPE, the plasma peptide detection was strongly reduced by 15–85%, compared with aqueous controls. These matrix effects were corrected after IS normalization and ranged from –9% to +12% (supplemental Fig. S3). Different plasma volumes (10, 20, 30, 40, and 50 µl) were also assessed, and 40 µl was found to be more suitable for assay sensitivity and proteolysis efficiency (not shown).

#### Reliability of the assay

After calibration curve analysis (n = 8), the mean  $R^2$  value ranged from  $0.967 \pm 0.012$  to  $0.998 \pm 0.001$  (linear regression, 1/x weighted, origin excluded), and the CVs never exceeded 14.5% over the concentration range tested (Fig. 3A, supplemental Table S7). For the QCs, the mean absolute bias did not deviate by more than  $\pm 14.8\%$ , compared with the expected concentrations (Fig. 3B). Intra- and inter-assay CVs never exceeded 14.2% and 14.3%, respectively (Fig. 3C, D; supplemental Table S8). Moreover, the signal-to-noise ratios measured at the lower LOQs were greater than 10 for all target peptides (supplemental Fig. S4). The assay variability was determined by using several aliquots of pooled human EDTA plasma diluted in bovine plasma at four dilution levels (n = 30 per dilution level). Samples were randomly injected into the LC-MS/MS instrument to estimate the carry-over between injections (Fig. 3E). As expected, the concentrations of peptides generated by trypsin proteolysis were linearly decreased according to the dilutions ( $R^2$  range: 0.889–1.000).

#### Comparison with other methods

The apolipoprotein concentrations measured by LC-MS/MS in individual EDTA plasma samples were similar to those obtained by immuno-turbidimetry, ELISA, and LC-HRMS (Fig. 4). The LC-MS/MS data were also strongly correlated with those obtained by the other techniques.

The Bland-Altman plots highlighted nonnegligible concentration differences between the analytical approaches, with deviations of up to 50%. The most marked differences in apolipoprotein concentrations were observed between LC-MS/MS and LC-HRMS measurements, suggesting that matrix effects strongly impacted the MS measurements. LC-HRMS (Orbitrap<sup>®</sup>) experiments were also limited compared with those performed by LC-MS/MS (triple quadrupole) because of HRMS lower level of multiplexing ability related to its lower dynamic range. Only a few outliers were identified from the Bland-Altman plots (<5%), and most of them were related to the initial sample quality (i.e., hemolyzed or opalescent appearance, Fig. 4). This observation was not systematic because 12 hemolyzed and 23 opalescent plasma samples were identified.

#### Apolipoprotein concentrations

The circulating apolipoprotein concentrations are provided in Table 2. Several plasma apolipoprotein concentrations were slightly but significantly different between males and females. To ensure assay repeatability, EDTA plasma measurements were repeated over five distinct experiments. The calculated CVs ranged from 1.8% to 13.7% and were within acceptable limits for MS experiments. Of note, intra- and inter-assay CVs calculated from the QC samples and the plasma pool never exceeded 15%, validating the reproducibility of the measurements and the quality of the preparation and analytical runs. The apolipoprotein concentrations were significantly over- or underestimated in serum, Li-heparin, and citrate plasma, in comparison to EDTA plasma. The plasma apolipoprotein concentrations were also compared with other biochemical data (supplemental Fig. S5). As expected, strong and significant correlations were found between apolipoproteins and lipids, strengthening the reliability of LC-MS/MS for providing relevant measurements (e.g., apoA-I versus HDL-C, apoB100 versus LDL-C, etc.).

#### Apolipoprotein polymorphisms

An expected distribution of apoE phenotypes with a predominance of apoE3 carriers was observed (Fig. 5A). The total apoE plasma concentrations were significantly different between the apoE phenotypes, with apoE2 and apoE4 carriers exhibiting the highest and the lowest concentrations, respectively (Fig. 5B). We also confirmed that the apoE2 levels were higher than apoE3 levels in E2/E3 heterozygote carriers, whereas apoE4 levels were lower than apoE3 levels in E2/E4 heterozygote carriers (Fig. 5C). The apoL1 phenotypes were also determined and showed a sharp predominance of the most common nonrisk G0/G0 phenotype (Fig. 5D). We did not find any significant difference in the total apoL1 concentrations according to the phenotype (Fig. 5E). However, the apoL1 isoforms were differently expressed in heterozygotes (G0 < G1 < G2) (Fig. 5F). In addition, the apo(a) polymorphic sizes were estimated by LC-MS/MS. Western blot experiments revealed that 65% of patients displayed two detectable apo(a) isoforms and showed that the smallest isoform was usually the most

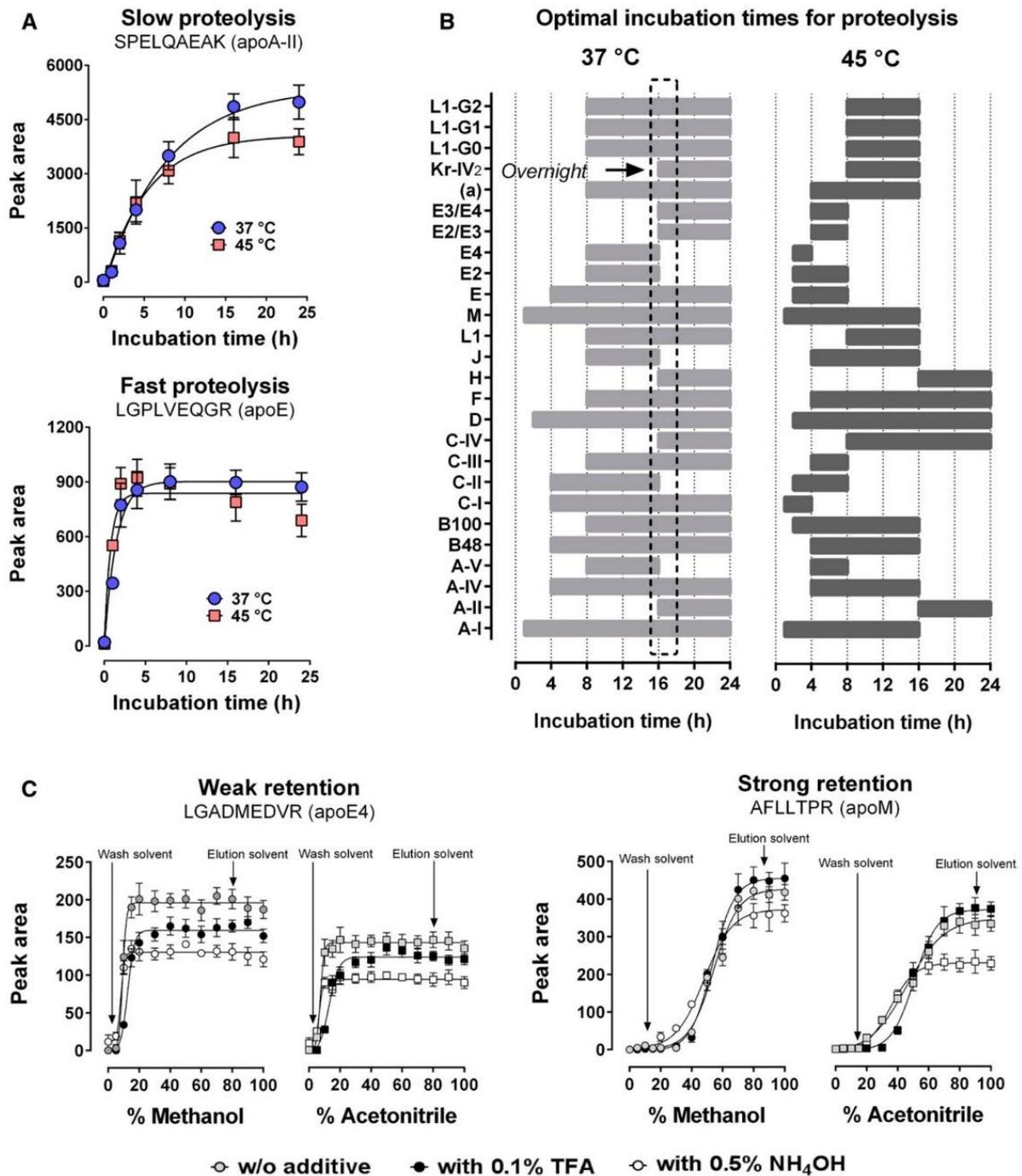
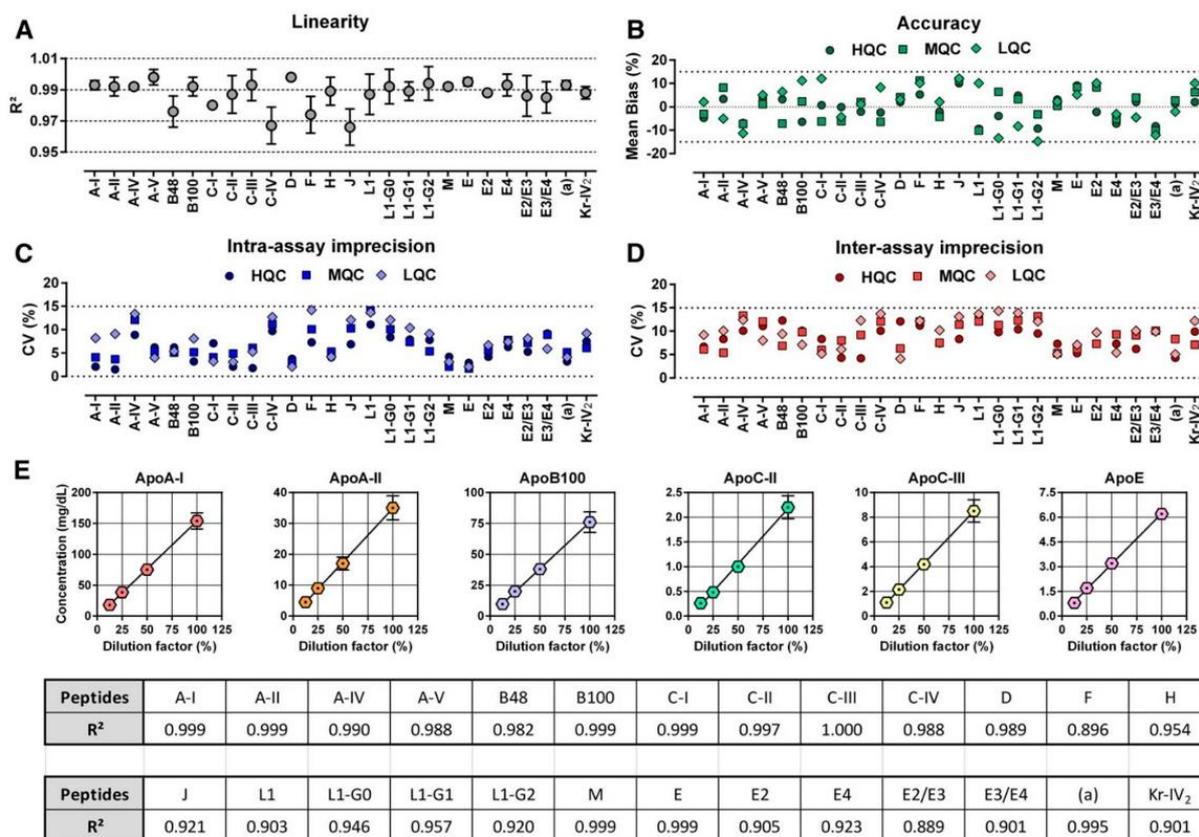


fig. 2. Optimization of sample preparation for apolipoprotein quantification. Trypsin incubation times were optimized using a mixture of human EDTA plasma samples. Solid-phase extraction protocols were optimized using bovine plasma samples spiked with a solution of synthetic peptides (MQC). A: Representative examples of peptides generated from trypsin digestion that require slow and fast proteolysis times. B: Summary of optimal incubation times for all proteotypic peptides of apolipoproteins in human plasma. The optimal digestion time is indicated by the black box. C: Representative examples of proteotypic peptides that were weakly or strongly retained in the cartridges (C<sub>18</sub>, reversed phase) during solid-phase extraction. Values are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (n = 8).



**Fig. 3.** LC-MS/MS validation, repeatability, and effect of matrix dilution. The analytical validation was performed over four distinct experiments. Synthetic peptides were spiked into EDTA bovine plasma and then submitted to the entire experimental process. Repeatability was evaluated using pooled human EDTA plasma serially diluted in bovine EDTA plasma. A: Assay linearity was illustrated by the  $R^2$  coefficient (mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 8$ ) calculated from calibration curves by linear regression analysis (origin excluded,  $1/x$  weighting). B: Assay accuracy was expressed by the mean bias between the theoretical and the measured concentration ( $n = 6 \times 4$  per level). Intra-assay (C) and inter-assay (D) imprecisions were expressed by the CVs obtained at each QC level ( $n = 6 \times 4$  per level). E: Repeatability of the assay and matrix effects (mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 30$  per dilution level, randomly injected). Dotted lines indicate our limits of acceptance ( $\pm 15\%$ ) in panels B, C, and D. LQC, low-concentration QC; MQC, middle-concentration QC; HQC, high-concentration QC.

abundant (Fig. 5G). Unlike Western blot, LC-MS/MS was not able to discriminate both isoforms in heterozygotes. However, the Bland-Altman plot showed that LC-MS/MS can reliably estimate the average size of apo(a) (Fig. 5H). LC-MS/MS analysis also confirmed the slight but significant negative correlation between the apo(a) plasma concentration and the average of apo(a) polymorphic size (Fig. 5I). Finally, LC-MS/MS was able to clearly discriminate intestinal apoB48 from hepatic apoB100, despite strong sequence homologies (Table 2).

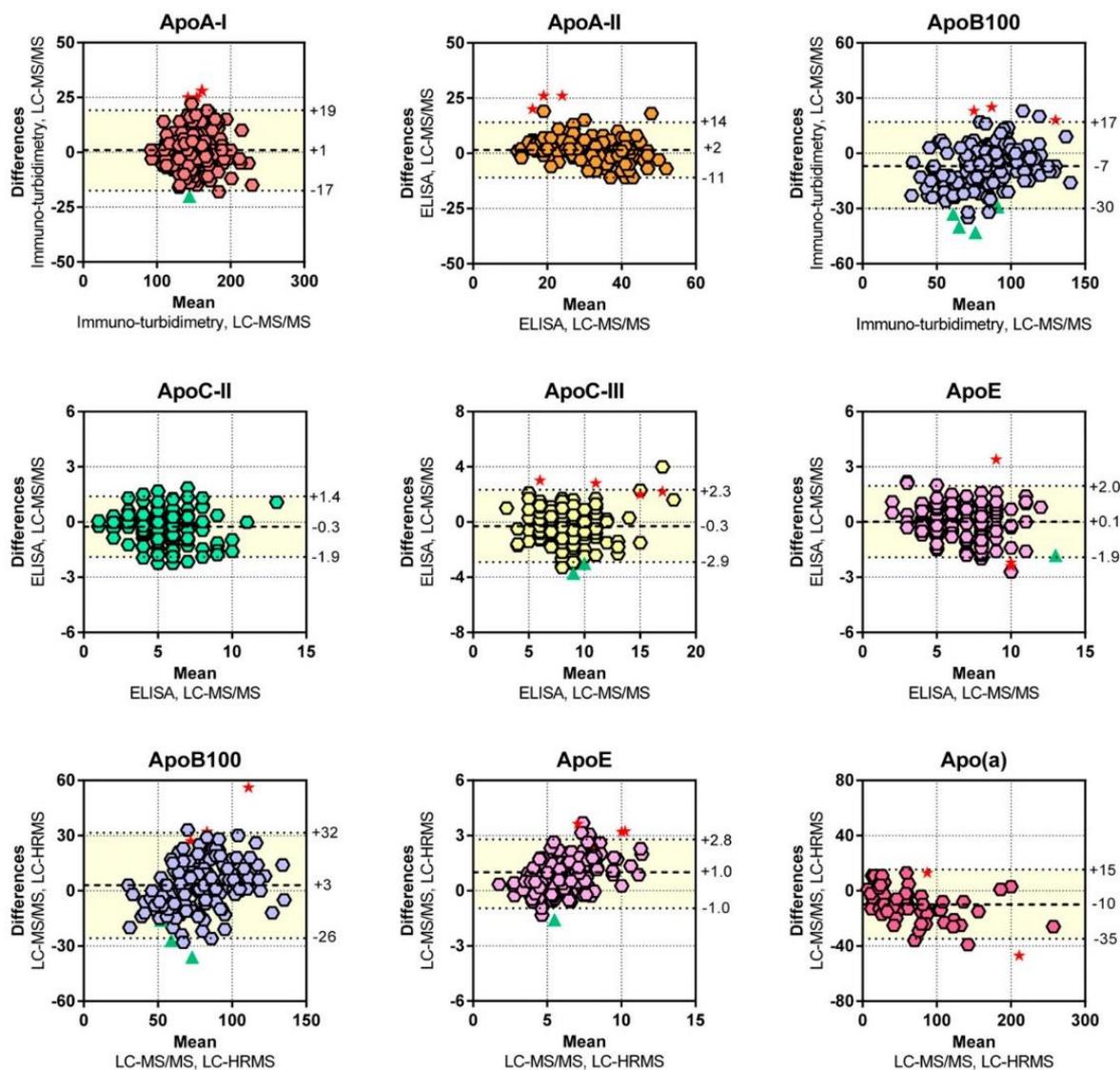
**Peptide and sample stabilities**

Because some peptides could be not highly stable during storage, we assessed the stability of stock solutions by using new freshly synthesized peptides. Stock solutions of the labeled and unlabeled synthetic peptides were found stable for 18 months at  $-20^\circ\text{C}$ . The peptides were also stable in bovine plasma throughout sample preparation processes. Digested samples were stable for 5 days under refrigeration ( $10^\circ\text{C}$ ) and for 18 months

at  $-20^\circ\text{C}$  (not shown). Furthermore, the stability of the biological samples was assessed on pooled plasma/serum samples (supplemental Table S9). Unlike serum, Li-heparin, and citrate plasma, the apolipoproteins were stable for 12 months at  $-80^\circ\text{C}$  and after five freeze/thaw cycles ( $-80^\circ\text{C}$ ). They were also stable for 24 h at room temperature, 1 week at  $4^\circ\text{C}$ , and 3 months at  $-20^\circ\text{C}$ . It is of note that oxidized forms of peptides carrying a methionine residue (+16 and/or +32 mass unit shift) were systematically detected after long-term storage or after repeated freeze/thaw cycles ( $>3$ ). This suggested that the use of oxidized synthetic peptides is warranted for evaluating and quantifying the possible degradation of samples during storage.

**DISCUSSION**

LC-MS/MS enables measurements of multiple apolipoproteins in a single run but requires specific sample



Spearman <i>r</i> coefficient ( <i>p</i> -value)	LC-MS/MS						
	ApoA-I	ApoA-II	ApoB100	ApoC-II	ApoC-III	ApoE	Apo(a)
Immuno-turbidimetry	0.92 (<0.0001)		0.85 (<0.0001)				
ELISA		0.86 (<0.0001)		0.91 (<0.0001)	0.82 (<0.0001)	0.91 (<0.0001)	
LC-HRMS			0.79 (<0.0001)			0.87 (<0.0001)	0.96 (<0.0001)

Fig. 4. Cross-validation of the LC-MS/MS assay with other techniques. Bland-Altman plots and Spearman correlations were generated to test the similarity of various methods (n = 160). For the Bland-Altman plots, the difference of values (y axis) obtained from two methods was plotted according to the average value obtained by two methods. The mean difference and the limits of agreement (colored area), corresponding to the 95% confidence level (i.e., mean ± 1.96 × standard deviation), are represented. Red stars indicate hemolyzed plasma samples. Green triangles indicate opalescent plasma samples. Spearman correlations between LC-MS/MS and other methods are indicated.

manipulations prior to analysis. Hence, the development of harmonized protocols is required to minimize between-laboratory variability and standardize such assays. Herein, we developed a high-throughput MS-based protocol for

large-scale profiling of human circulating apolipoproteins. All steps of sample preparation were optimized from a commercially available kit before being validated according to standard guidelines. The method was then compared

TABLE 2. Apolipoprotein concentrations in nonfasted individuals and matrix effect assessment

Apolipoprotein	EDTA Plasma (n = 160)				Serum (n = 160)	Li-Heparin Plasma (n = 72)	Citrate Plasma (n = 54)
	Male (n = 80)	Female (n = 80)	P <sup>a</sup>	CV (%)			
						Mean Bias (%) <sup>b</sup>	
ApoA-I	145 [126–160]	154 [133–178]	0.0016	5.6	+5.4	+1.2	-2.3
ApoA-II	33 [26–39]	34 [28–39]	0.5868	8.1	+37.2 <sup>c</sup>	+29.4 <sup>c</sup>	+17.3 <sup>d</sup>
ApoA-IV	9 [8–11]	9 [11–13]	0.0002	10.1	-8.8 <sup>c</sup>	-16.3 <sup>c</sup>	-18.4 <sup>c</sup>
ApoA-V	0.02 [0.01–0.06]	0.02 [0.01–0.04]	0.0452	11.3	+34.2 <sup>c</sup>	+30.1 <sup>c</sup>	+16.9 <sup>c</sup>
ApoB48	1.4 [1.3–1.6]	1.7 [1.5–1.9]	0.0001	9.8	+12.1 <sup>c</sup>	+9.5 <sup>c</sup>	+11.5 <sup>d</sup>
ApoB100	86 [68–100]	74 [55–96]	0.1059	4.8	+18.3 <sup>c</sup>	+14.6 <sup>c</sup>	+9.4 <sup>d</sup>
ApoC-I	3.9 [3.1–4.9]	3.4 [2.6–4.0]	0.0024	2.4	+16.2 <sup>b</sup>	+7.6 <sup>c</sup>	+2.1
ApoC-II	5.5 [4.1–6.9]	4.4 [3.4–5.9]	0.0009	4.2	+8.3 <sup>c</sup>	-5.6 <sup>d</sup>	-16.4 <sup>c</sup>
ApoC-III	8.0 [6.6–10.2]	7.5 [6.4–8.9]	0.0045	5.2	+7.9	+2.1	-3.2
ApoC-IV	0.09 [0.07–0.17]	0.04 [0.03–0.12]	0.0001	12.5	-14.5 <sup>c</sup>	-21.3 <sup>c</sup>	-18.9 <sup>c</sup>
ApoD	3.8 [3.2–4.3]	3.1 [2.5–3.5]	0.0001	2.7	+8.8 <sup>c</sup>	+2.1	-1.4
ApoE	6.4 [5.1–7.8]	6.3 [5.1–7.8]	0.4685	7.3	+58.7 <sup>c</sup>	+47.3 <sup>c</sup>	+43.2 <sup>c</sup>
ApoF	0.38 [0.16–0.67]	0.44 [0.24–0.73]	0.1284	13.7	+5.4	+7.1	+3.5
ApoH	5.5 [4.7–6.3]	5.2 [4.6–5.9]	0.3832	4.8	+62.4 <sup>c</sup>	+59.3 <sup>c</sup>	+44.7 <sup>c</sup>
ApoJ	11 [9–14]	11 [10–13]	0.4713	9.4	-4.3 <sup>c</sup>	+2.1	-6.1 <sup>c</sup>
ApoL1	1.0 [0.9–1.2]	1.3 [1.1–1.8]	0.0001	11.8	-6.3 <sup>d</sup>	+1.2	+1.2
ApoM	2.5 [2.1–2.9]	2.4 [2.0–2.7]	0.1566	1.8	-5.4 <sup>c</sup>	-2.3 <sup>c</sup>	-1.8
Apo(a) (nM)	22 [12–63]	39 [16–77]	0.1085	3.8	+34.2 <sup>c</sup>	+21.4 <sup>c</sup>	+15.3 <sup>c</sup>

Values are medians [25th to 75th percentiles]. Apolipoprotein concentrations are in milligrams per deciliter, unless otherwise specified. EDTA plasma samples were assayed five times. CVs were calculated over five experiments.

<sup>a</sup>Mann-Whitney test or unpaired *t*-test.

<sup>b</sup>Wilcoxon matched-pairs signed rank test or paired *t*-test.

<sup>c</sup>*P* < 0.001.

<sup>d</sup>*P* < 0.01.

<sup>e</sup>*P* < 0.05.

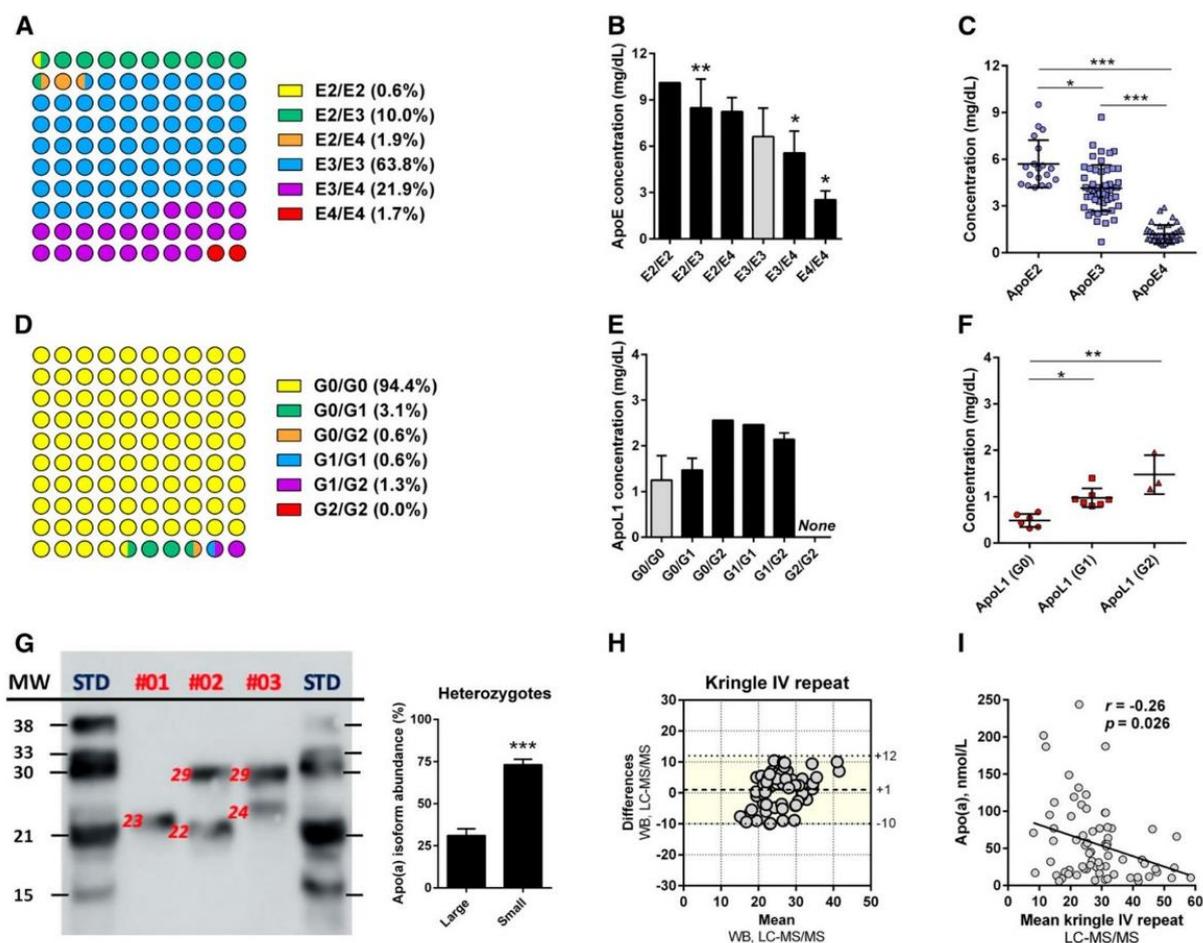
with other techniques and was shown to be reliable for apolipoprotein quantification and major SNP determination at very competitive costs, compared with traditional assays.

Lipoprotein metabolism abnormalities are important in metabolic diseases leading to CVD (1, 3, 4). Because apolipoproteins direct lipoprotein metabolism, their measurements can be used to improve CVD risk prediction primarily based on traditional plasma lipid testing (3). Beyond apoA-I and apoB (1, 16, 27), strong associations have been reported between CVD risk and apoC-II, apoC-III, and apoE plasma levels (7, 10, 28). The risk of developing cardiovascular or metabolic diseases also has been associated with other apolipoproteins (2, 5, 28–30), whose functions are less understood and deserve further investigations (3, 31, 32). Moreover, the detection of disease-specific polymorphisms could increase the specificity of CVD risk assessment, as some isoforms display altered functionalities (12, 16, 24, 33, 34).

Whereas current immunoassays are unavailable for some apolipoproteins and lack the capacity for multiplexing, MS enables the analysis of multiple molecules from a single sample preparation (3). MS can also detect and quantify apolipoprotein variants resulting from a single amino acid mutation (22, 24). Hence, MS constitutes a powerful tool for the large-scale profiling of apolipoproteins (14–16, 35, 36). However, MS protocols involve multiple steps: enzymatic digestion of complex samples to transform proteins into peptides (13); SPE to reduce sample complexity; and LC-MS/MS to separate and detect signature peptides. Thus, MS-based assays suffer from great heterogeneity stemming from the lack of harmonized protocols including the applied sampling material, proteolysis conditions, cleaning methods, and proteolytic peptides (3).

The selection of peptide markers is critical to accurately quantify proteins by LC-MS/MS. They must be stable, sensitive, efficiently released from proteolysis, and not interfere with nontargeted proteins. Our peptide candidates satisfy these criteria, and most of them have already been validated (12, 14–16, 22, 23, 36, 37). Nevertheless, despite careful method validations, the differences noticed in peptide selection could contribute to some extent to between-laboratory variability. Our set of peptide markers was successfully validated in terms of linearity, specificity, low LOQ, precision, accuracy, and short- and long-term stabilities (18, 19). However, due to the high specificity, a single subtle modification of a peptide sequence, such as a single amino acid substitution or the oxidation of a methionine residue, will substantially alter the mass of the wild-type or native peptide and, as a result, preclude proper detection by MS. Here, we selected one peptide per target apolipoprotein to screen a large set of species, but the selection of two to three peptide markers per apolipoprotein (when possible) should be warranted for improving between-laboratory reproducibility and detecting any deviating responses (3).

Another source of variability is the proteolysis yield, which leads to an optimal release of peptide markers and is related to the selected material, reagents, experimental conditions, and choice of signature peptides (14–16). To maximize the between-laboratory reproducibility, we used a commercial kit specifically dedicated for proteomics. All manufacturers' instructions were validated and/or optimized to improve assay efficiency on our set of peptides, and we used internal controls (QCs and plasma pools) for validating each analytical batch. However, the use of certified reference standards is required for clinical implementation



**Fig. 5.** LC-MS/MS analysis of apoE, apoL1, and apo(a) polymorphisms. A: Distribution of the apoE phenotype was determined by LC-MS/MS and LC-HRMS (100% agreement). B, C: Influence of the apoE phenotype on the total apoE plasma concentration and the plasma concentrations of the apoE isoforms in heterozygous patients (E2/E3, E2/E4, and E3/E4). D: Distribution of the apoL1 phenotype as determined by LC-MS/MS. E, F: Influence of the apoL1 phenotype on the total apoL1 plasma concentration and the plasma concentrations of the apoL1 isoforms in heterozygous patients (G0/G1, G0/G2, and G1/G2). G: Determination of apo(a) polymorphic sizes [kringle IV (KrIV) repeats] by Western blot. H: Bland-Altman plots were generated to test the similarity of LC-MS/MS and Western blot for the determination of the apo(a) polymorphic size (n = 71, LC-MS/MS detectable values). The mean difference and the limits of agreement (colored area), corresponding to the 95% confidence level (i.e., mean  $\pm$  1.96  $\times$  standard deviation), are represented. I: Influence of the apo(a) polymorphic size on the apo(a) plasma concentration (Spearman's test). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Kruskal-Wallis test). For B and E, the plasma concentrations were compared with the healthy phenotypes (i.e., E3/E3 or G0/G0).

of apolipoprotein measurements and for ascertaining proteolysis efficiency.

Despite using SPE, the peptide markers were strongly impacted by matrix effects, causing sharp and variable signal reductions. This was corrected by using dedicated ISs enriched with stable isotopes. Our investigations confirmed that the applied sampling material and anticoagulant significantly influenced the results (15), possibly due to matrix effects, different proteolysis yields, or sample stability. EDTA plasma was selected as the reference material, but further studies are needed prior to the implementation of standardized protocols. Importantly, the measurement of plasma apolipoproteins may be clinically less relevant than lipoprotein subclass-specific analysis (3).

Matrix effects were strongly reduced in lipoprotein subclasses isolated by ultracentrifugation, gel filtration, or phosphotungstic acid precipitation of apoB-containing particles (not shown). While ultracentrifugation or gel filtration processes would complicate protocol harmonization, precipitation could be easily standardized even if analyses are limited to apoA-I-containing (HDL) or apoB-containing (non-HDL) particles.

It is of note that MS requires an initial expensive investment in both apparatus acquisition and maintenance (especially high-resolution systems). However, its high ability for multiplexing (especially triple quadrupole systems) allows for the reduction of sample volumes (<50  $\mu$ l vs. several aliquots of up to 1 ml), experimental times ( $\sim$ 400 samples  $\times$  18

markers can be performed per week per instrument), and costs (by at least 10-fold), compared with traditional immunoassays. Therefore, LC-MS/MS enables large-scale profiling of plasma apolipoproteins in large cohorts, which is essential for improving the sensitivity of studies regarding the determination of novel CVD risk markers (1). Another advantage of LC-MS/MS for apolipoprotein metabolism studies is its ability to conduct metabolic flux analyses with stable isotope-labeled tracers. The labeled tracer (e.g.,  $^3\text{H}_3$ -leucine) is perfused or injected into patients, and blood samples are collected. Its incorporation within apolipoproteins is then measured over time by LC-MS/MS, and the production and catabolic rates are deduced from kinetic curves (9, 21, 24, 25). All peptide markers selected here carry at least one leucine residue (except apoH), which makes it possible to conduct such studies. In addition, apolipoproteins also exhibit proteoforms arising from posttranslational modifications that could dramatically affect their functionalities (17). Some studies have unraveled the presence and alteration of such modifications for apolipoproteins in diabetes and CVD (38–40). However, such proteoforms are numerous and present at low stoichiometric levels. Therefore, their study often requires specific enrichment methods prior to LC-MS/MS analyses (41) and remains a huge challenge.

In conclusion, MS not only allows the large-scale profiling of circulating apolipoproteins in human cohorts but also enables further research investigations that traditional immunoassays cannot achieve. The attractive costs and the reduced experimental times associated with multiplexed LC-MS/MS assays make this technique of interest for clinical diagnostics. Nevertheless, LC-MS/MS in clinical laboratories still requires a high level of standardization, including: 1) automated sample preparation; 2) the selection of appropriate sampling materials (e.g., EDTA plasma); 3) the harmonized selection of peptide markers; and 4) the use of certified reference standards.

#### Data availability

All data are contained within the article or in the supplemental material section. All chromatograms used for quantification are available in the supplemental material. [Fig. 1](#)

#### REFERENCES

- Dominiczak, M. H., and M. J. Caslake. 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann. Clin. Biochem.* **48**: 498–515.
- Perdomo, G., and H. Henry Dong. 2009. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging (Albany NY)*. **1**: 17–27.
- van den Broek, I., K. Sobhani, and J. E. Van Eyk. 2017. Advances in quantifying apolipoproteins using LC-MS/MS technology: implications for the clinic. *Expert Rev. Proteomics*. **14**: 869–880.
- Renee Ruhaak, L., A. van der Laarse, and C. M. Cobbaert. 2019. Apolipoprotein profiling as a personalized approach to the diagnosis and treatment of dyslipidaemia. *Ann. Clin. Biochem.* **56**: 338–356.
- Brahimaj, A., S. Lighthart, M. A. Ikram, A. Hofman, O. H. Franco, E. J. G. Sijbrands, M. Kavousi, and A. Dehghan. 2017. Serum levels of apolipoproteins and incident type 2 diabetes: a prospective cohort study. *Diabetes Care*. **40**: 346–351.
- Tsimikas, S. 2017. A test in context: lipoprotein(a): diagnosis, prognosis, controversies, and emerging therapies. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**: 692–711.
- Chan, D. C., M. M. Chen, E. M. M. Ooi, and G. F. Watts. 2008. An ABC of apolipoprotein C-III: a clinically useful new cardiovascular risk factor? *Int. J. Clin. Pract.* **62**: 799–809.
- Smith, D., G. F. Watts, C. Dane-Stewart, and J. C. Mamo. 1999. Postprandial chylomicron response may be predicted by a single measurement of plasma apolipoprotein B48 in the fasting state. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**: 204–209.
- Croyal, M., S. Billon-Crossouard, S. Goulitquer, A. Aguesse, L. León, F. Fall, M. Chétiveaux, T. Moyon, V. Blanchard, K. Ouguerram, et al. 2018. Stable isotope kinetic study of apoM (apolipoprotein M). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**: 255–261.
- Huang, Y. 2010. Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**: 337–345.
- Blanchard, V., M. Croyal, I. Khantalin, S. Ramin-Mangata, K. Chemello, B. Nativel, D. J. Blom, A. D. Marais, and G. Lambert. 2019. Reduced lipoprotein(a) associated with the apolipoprotein E2 genotype confers cardiovascular protection in familial hypercholesterolemia. *JACC Basic Transl. Sci.* **4**: 425–427.
- Martínez-Morillo, E., H. M. Nielsen, I. Batruch, A. P. Drabovich, I. Begcevic, M. F. Lopez, L. Minthon, G. Bu, N. Mattsson, E. Portelius, et al. 2014. Assessment of peptide chemical modifications on the development of an accurate and precise multiplex selected reaction monitoring assay for apolipoprotein E isoforms. *J. Proteome Res.* **13**: 1077–1087.
- Giansanti, P., L. Tsiatsiani, T. Y. Low, and A. J. R. Heck. 2016. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nat. Protoc.* **11**: 993–1006.
- Ceglarek, U., J. Dittrich, S. Becker, F. Baumann, L. Kortz, and J. Thiery. 2013. Quantification of seven apolipoproteins in human plasma by proteotypic peptides using fast LC-MS/MS. *Proteomics Clin. Appl.* **7**: 794–801.
- Dittrich, J., M. Adam, H. Maas, M. Hecht, M. Reinicke, L. R. Ruhaak, C. Cobbaert, C. Engel, K. Wirkner, M. Löffler, et al. 2018. Targeted on-line SPE-LC-MS/MS assay for the quantitation of 12 apolipoproteins from human blood. *Proteomics*. **18**: doi:10.1002/pmic.201700279.
- van den Broek, I., F. P. H. T. M. Romijn, J. Nouta, A. van der Laarse, J. W. Drijfhout, N. P. M. Smit, Y. E. M. van der Burgt, and C. M. Cobbaert. 2016. Automated multiplex LC-MS/MS assay for quantifying serum apolipoproteins A-I, B, C-I, C-II, C-III, and E with qualitative apolipoprotein E phenotyping. *Clin. Chem.* **62**: 188–197.
- Nedelkov, D. 2017. Mass spectrometric studies of apolipoprotein proteoforms and their role in lipid metabolism and type 2 diabetes. *Proteomes*. **5**: 27.
- Pum, J. 2019. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv. Clin. Chem.* **90**: 215–281.
- Allinson, J. L. 2018. Clinical biomarker validation. *Bioanalysis*. **10**: 957–968.
- Carr, S. A., S. E. Abbatiello, B. L. Ackermann, C. Borchers, B. Domon, E. W. Deutsch, R. P. Grant, A. N. Hoofnagle, R. Hüttenhain, J. M. Koomen, et al. 2014. Targeted peptide measurements in biology and medicine: best practices for mass spectrometry-based assay development using a fit-for-purpose approach. *Mol. Cell. Proteomics*. **13**: 907–917.
- Croyal, M., F. Fall, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, Y. Zaïr, K. Ouguerram, M. Krempf, and E. Nobécourt. 2016. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* **57**: 509–515.
- Zhou, H., M. Hoek, P. Yi, R. J. Rohm, A. Mahsut, P. Brown, J. Saunders, R. A. Chmielowski, N. Ren, D. Shuster, et al. 2013. Rapid detection and quantification of apolipoprotein L1 genetic variants and total levels in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**: 2639–2647.
- Pan, Y., H. Zhou, A. Mahsut, R. J. Rohm, O. Berejniaia, O. Price, Y. Chen, J. Castro-Perez, M. E. Lassman, D. McLaren, et al. 2014. Static and turnover kinetic measurement of protein biomarkers involved in triglyceride metabolism including apoB48 and apoA5 by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* **55**: 1179–1187.
- Blanchard, V., S. Ramin-Mangata, S. Billon-Crossouard, A. Aguesse, M. Durand, K. Chemello, B. Nativel, L. Flet, M. Chétiveaux, D.

- Jacobi, et al. 2018. Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study. *J. Lipid Res.* **59**: 892–900.
25. Croyal, M., K. Ouguerram, M. Passard, V. Ferchaud-Roucher, M. Chéteux, S. Billon-Crossouard, A.-C. de Gouville, G. Lambert, M. Krempf, and E. Nobécourt. 2015. Effects of extended-release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**: 2042–2047.
26. Bland, J. M., and D. G. Altman. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* **1**: 307–310.
27. Marcovina, S., and C. J. Packard. 2006. Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *J. Intern. Med.* **259**: 437–446.
28. Pechlaner, R., S. Tsimikas, X. Yin, P. Willeit, F. Baig, P. Santer, F. Oberhollenzer, G. Egger, J. L. Witztum, V. J. Alexander, et al. 2017. Very-low-density lipoprotein-associated apolipoproteins predict cardiovascular events and are lowered by inhibition of APOC-III. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**: 789–800.
29. Tavernier, G., S. Caspar-Bauguil, and N. Viguerie. 2020. Apolipoprotein M: new connections with diet, adipose tissue and metabolic syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.* **31**: 8–14.
30. Bick, A. G., E. Akwo, C. Robinson-Cohen, K. Lee, J. Lynch, T. L. Assimes, S. DuVall, T. Edwards, H. Fang, S. M. Freiberg, et al. 2019. Association of APOL1 risk alleles with cardiovascular disease in blacks in the million veteran program. *Circulation.* **140**: 1031–1040.
31. Tailleux, A., P. Duriez, J.-C. Fruchart, and V. Clavey. 2002. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **164**: 1–13.
32. Wang, F., A. B. Kohan, C.-M. Lo, M. Liu, P. Howles, and P. Tso. 2015. Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *J. Lipid Res.* **56**: 1403–1418.
33. Genovese, G., D. J. Friedman, M. D. Ross, L. Lecordier, P. Uzureau, B. I. Freedman, D. W. Bowden, C. D. Langefeld, T. K. Oleksyk, A. L. Uscinski Knob, et al. 2010. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science.* **329**: 841–845.
34. Erqou, S., A. Thompson, E. Di Angelantonio, D. Saleheen, S. Kaptoge, S. Marcovina, and J. Danesh. 2010. Apolipoprotein(a) isoforms and the risk of vascular disease: systematic review of 40 studies involving 58,000 participants. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**: 2160–2167.
35. Agger, S. A., L. C. Marney, and A. N. Hoofnagle. 2010. Simultaneous quantification of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B by liquid-chromatography-multiple-reaction-monitoring mass spectrometry. *Clin. Chem.* **56**: 1804–1813.
36. von Zychlinski, A., M. Williams, S. McCormick, and T. Kleffmann. 2014. Absolute quantification of apolipoproteins and associated proteins on human plasma lipoproteins. *J. Proteomics.* **106**: 181–190.
37. Lassman, M. E., T. M. McLaughlin, H. Zhou, Y. Pan, S. M. Marcovina, O. Laterza, and T. P. Roddy. 2014. Simultaneous quantitation and size characterization of apolipoprotein(a) by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**: 1101–1106.
38. Koska, J., H. Yassine, O. Trenchevska, S. Sinari, D. C. Schwenke, F. T. Yen, D. Billheimer, R. W. Nelson, D. Nedelkov, and P. D. Reaven. 2016. Disialylated apolipoprotein C-III proteoform is associated with improved lipids in prediabetes and type 2 diabetes. *J. Lipid Res.* **57**: 894–905.
39. Azizkhanian, I., O. Trenchevska, Y. Bashawri, J. Hu, J. Koska, P. D. Reaven, R. W. Nelson, D. Nedelkov, and H. N. Yassine. 2016. Posttranslational modifications of apolipoprotein A-II proteoforms in type 2 diabetes. *J. Clin. Lipidol.* **10**: 808–815.
40. Yassine, H. N., A. M. Jackson, P. D. Reaven, D. Nedelkov, R. W. Nelson, S. S. Lau, and C. H. Borchers. 2014. The application of multiple reaction monitoring to assess Apo A-I methionine oxidations in diabetes and cardiovascular disease. *Transl. Proteom.* **4–5**: 18–24.
41. Chatterjee, B., and S. S. Thakur. 2018. Investigation of post-translational modifications in type 2 diabetes. *Clin. Proteomics.* **15**: 32.

## **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

### **High-throughput mass spectrometry-based assay for the large-scale profiling of circulating human apolipoproteins**

Valentin Blanchard, Michel Krempf, Damien Garçon, Catherine Jaunet, Kevin Chemello,  
Stéphanie Billon-Crossouard, Audrey Aguesse, Aya Garfa, Gilles Famchon, Amada Torres,  
Cédric Le May, Matthieu Pichelin, Edith Bigot-Corbel, Gilles Lambert, Bertrand Cariou,  
Samy Hadjadj, Kalyane Bach-Ngohou, Mikaël Croyal

## SUPPLEMENTAL METHODS

**Lipid measurements** – Plasma cholesterol (free and esterified), plasma phospholipids, plasma triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) concentrations were measured individually using enzymatic kits from Diasys, according to the manufacturer's instructions (Grabels, France).

**Estimate of apo(a) size mean from kringle IV copy number by LC-MS/MS** – As the target peptide LFLEPTQADIALLK is unique in apo(a), 1 mole of apo(a) was assumed to be equal to 1 mole of this peptide. As the target peptide GTYSTTVTGR is repeated in the kringle IV<sub>1</sub>,  $n \times$  IV<sub>2</sub>, IV<sub>3</sub>, and IV<sub>5</sub> domains but not in the IV<sub>4</sub>, IV<sub>6</sub>, IV<sub>7</sub>, IV<sub>8</sub>, IV<sub>9</sub>, and IV<sub>10</sub> domains, the total number of kringle IV was equal to  $([GTYSTTVTGR]_{nM} \div [LFLEPTQADIALLK]_{nM}) + 6$ . Therefore, the result expressed the exact apo(a) size or the apo(a) mean size, depending on whether one unique isoform is expressed (homozygous individuals) or two apo(a) isoforms (heterozygous individuals) are expressed, respectively (Croyal et al., 2015).

**ApoE phenotyping** – ApoE phenotypes based on the three major isoforms (apoE2/E3/E4) were confirmed by LC-MS/MS and LC-HRMS in plasma samples according to the presence of different combinations of peptides (Supplemental Figure S1): E2/E2 phenotype (LGADMEDVCGR, CLAVYQAGAR), E2/E3 phenotype (LGADMEDVCGR, CLAVYQAGAR, LAVYQAGAR), E2/E4 phenotype (LGADMEDVCGR, CLAVYQAGAR, LGADMEDVR, LAVYQAGAR), E3/E3 phenotype (LGADMEDVCGR, LAVYQAGAR), E3/E4 phenotype (LGADMEDVCGR, LAVYQAGAR, LGADMEDVR), and E4/E4 phenotype (LGADMEDVR, LAVYQAGAR). This approach was previously validated by ourselves and others in individuals with genetically confirmed *APOE* genotypes (Blanchard et al., 2019, 2018; Martínez-Morillo et al., 2014).

**Quantification of apoE major isoforms** – Specific CLAVYQAGAR and LGADMEDVR peptides were used for apoE2 and apoE4 quantification, respectively. Unlike apoE2 and apoE4, the apoE3 isoform has no proteotypic peptide. After apoE phenotyping, the apoE3 concentration was calculated by subtracting the measured concentrations of apoE2 (E2/E3 phenotype) and apoE4 (E3/E4 phenotype) from the total apoE (LGPLVEQGR) concentration. The common peptides of apoE2/E3 (LGADMEDVCGR) and apoE3/E4 (LAVYQAGAR) were used to confirm these apoE3 concentrations, with a maximum variation of 10% between both approaches set as the acceptance criterion.

**Quantification of apoL1 major isoforms** – Unlike apoE, apoL1 isoforms (G0, G1, and G2) have specific peptides. Specific LNILNNNYK, LNMLNNNYK, and LNILNNK peptides were used for apoL1-G0, apoL1-G1, and apoL1-G2 quantification, respectively (Supplemental Figure S1). We assumed that the total apoL1 concentration in homozygous individuals (G0/G0, G1/G1 and G2/G2) was equal to that obtained from the specific peptides of the apoL1 isoforms. In heterozygous individuals (G0/G1, G0/G2, and G1/G2), the total apoL1 concentration was calculated by adding the concentrations of each apoL1 isoform obtained from their specific peptides. The total apoL1 concentration obtained from the common VAQELEEK peptide was used for validation, with a maximum variation of 10% between both approaches set as the acceptance criterion.

**Specific determination of apoB48 concentrations** – As shown in Supplemental Figure S1, specific signature peptides were selected to clearly discriminate and specifically quantify apoB48 and apoB100. Therefore, specific LSQLQTYMI and ATGVLYDYVNK peptides were used for apoB48 and apoB100 quantification, respectively.

**Cross-validations** – ApoA-I and apoB100 measurements were carried out in the accredited laboratory of Clinical Biochemistry of the University Hospital of Nantes (the laboratory was accredited according to the standard NF EN ISO 15189) using immuno-turbidimetry on an

automated Cobas® 6000 system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The inter-assay variation did not exceed 6.05% and 4.23% for apoA-I and apoB100, respectively. The apoA-II, apoC-II, apoC-III, and apoE plasma concentrations were measured by sandwich ELISA, according to the supplier's instructions (Assaypro LLC, St. Charles, MO, USA, for apoC-III and apoE; Elabscience, Houston, TX, USA, for apoA-II and apoC-II). The apoB100, apoE, and apo(a) concentrations were also measured by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) using the same sample preparation procedure as for the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) experiments. LC-HRMS was also used to cross-check the apoE phenotypes. The ability of LC-MS/MS to clearly discriminate the apoE isoforms (E2/E3/E4) in patients with known *APOE* genotypes has already been validated (Blanchard et al., 2019, 2018; van den Broek et al., 2016; Martínez-Morillo et al., 2014). LC-HRMS analyses were carried out on a Dionex Ultimate 3000 UHPLC System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) interfaced with a Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Data were collected in positive heated electrospray ionization mode. Instrument control and data acquisition were done using Xcalibur software (Version 4.3, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Analyses were performed using Skyline software (version 19.1, MacCoss Lab, Seattle, WA, USA). The optimized LC-HRMS parameters are detailed in Supplemental Table S5 and Supplemental Table S6. Finally, the apo(a) size, defined as the number of repeated kringle IV domains, was also determined by western blot, as described below.

**Measurements of apo(a) kringle IV copy number by western blot** – Plasma samples were mixed with 4× loading buffer (100 mM Tris base, 2 mM EDTA, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 20% glycerol, and 0.1% bromophenol blue) and deionized water for a final apo(a) concentration of 2 fM. Molecular weight standards were prepared from a mixture of six plasma samples from individuals carrying genetically validated apo(a) isoform sizes. The 3% agarose

gels were prepared with 750 mg agarose, 250  $\mu$ L of 10 $\times$  TBE buffer (900 mM Tris base, 900 mM boric acid, and 20 mM EDTA), and enough deionized water so that the total volume was 25 mL before heating for polymerization. Samples and standard (10  $\mu$ L) were loaded onto the gels, and electrophoresis was performed in 20 $\times$  TBE buffer (900 mM Tris base, 900 mM boric acid, and 20 mM EDTA) for 5 h at 65 mA. After electrophoresis, proteins were transferred in a semi-dry transfer cell onto a nitrocellulose membrane in buffer containing 25 mM Tris base, 192 mM glycine, 20% methanol, and 0.1% SDS for 1 h at 35 mA. The membranes were blocked for 1 h in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween and 5% fat-free milk powder. The membranes were then incubated with the TA310972 anti-LPA rabbit monoclonal antibody (Origene Technologies, Rockville, MD, USA) diluted 1:20,000 in PBS containing 0.05% Tween for 1 h. The membranes were washed three times in PBS containing 0.05% Tween and subsequently incubated for 1 h with a horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) diluted 1:10,000 in PBS containing 0.05% Tween and 5% bovine serum albumin. The membranes were washed as described previously, and the bands were analyzed by chemiluminescence using SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific) on an Amersham Imager 680 with imaging software (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France).

**SUPPLEMENTAL TABLES**

**Supplemental Table S1. Biochemical characteristics of patients (median [range]) in the nonfasted state.** Mann-Whitney test or the unpaired t-test.

<b>Parameter</b>	<b>Males</b>	<b>Females</b>	<b>P-value</b>
<i>n</i>	80	80	---
Age, years	42 [18–70]	31 [18–68]	0.0057
Total cholesterol, mg/dL	191 [118–348]	218 [135–348]	0.0006
Free cholesterol (mg/dL)	40 [25–59]	52 [27–87]	0.0001
Esterified cholesterol (mg/dL)	132 [90–193]	164 [105–261]	0.0001
HDL cholesterol, mg/dL	50 [28–95]	58 [27–94]	0.0043
LDL cholesterol, mg/dL	122 [51–217]	133 [51–316]	0.0521
Triglycerides, mg/dL	100 [30–340]	102 [55–231]	0.4172
Phospholipids, mg/dL	132 [99–216]	199 [126–342]	0.0001

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

**Supplemental Table S2. Compositions of working solutions used for sample preparation (ProteinWorks™ eXpress kit, Waters).**

<b>Name</b>	<b>Reagent</b>	<b>Concentration</b>	<b>Solvent</b>
Digestion buffer	Ammonium bicarbonate	50 mM, pH 8	Ultra-pure water
Detergent	RapidGest	7 mg/mL	Digestion buffer
Reducing agent	Dithiothreitol	70 mM	Digestion buffer
Alkylation agent	Iodoacetamide	142 mM	Digestion buffer
Enzyme	Trypsin	7 mg/mL	HCl 1 mM
Inactivating agent	Trifluoroacetic acid	20%	Ultra-pure water

**Supplemental Table S3. Summary of LC-MS/MS conditions (Xevo TQD, Waters).**

Parameter	Condition
Column	Acquity BEH C <sub>18</sub> ; 1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm (Waters)
Mobile phase A	0.1% formic acid in 5:95 acetonitrile:water (v/v)
Mobile phase B	0.1% formic acid in acetonitrile
Linear gradient	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B = 1% for 0.5 min</li> <li>• 1% to 80% of mobile phase B in 7 min</li> <li>• B = 80% for 1.5 min</li> <li>• 80% to 1% of mobile phase B in 1 min</li> <li>• B = 1% for 2 min</li> </ul>
Flow rate	250 μL/min
Injection volume	10 μL
Column temperature	60 °C
Polarity	Positive ESI (V mode)
Capillary voltage	3 kV
Desolvation gas flow	1,000 L/h
Cone gas flow	50 L/h
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	400 °C
Desolvation gas	Dinitrogen N <sub>2</sub>
CID gas	Argon
Acquisition mode	MS/MS
MRM transitions	<i>See Supplemental Table S3</i>

**Supplemental Table S4. Multiple reaction monitoring (MRM) parameters used for proteotypic peptide detection.**

Apo	Sequence	MRM ( <i>m/z</i> )	Cone/Collision	Fragment
ApoA-I	ATEHLSTLSEK	406.2 → 573.2	25/15 V	$y_{10}^{2+}$
ApoA-I (IS)	ATEHLSTLSE- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$ K	408.9 → 577.2		
ApoA-II	SPELQAEAK	486.8 → 659.3	30/15 V	$y_6^+$
ApoA-II (IS)	SPELQAEA- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$ K	490.3 → 667.3		
ApoA-IV	SELTQQLNALFQDK	818.5 → 537.4	40/35 V	$y_4^+$
ApoA-IV (IS)	SELTQQLNALFQD- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$ K	822.5 → 545.4		
ApoA-V	VQELQEQLR	572.4 → 915.7	35/23 V	$y_7^+$
ApoA-V (IS)	VQELQEQL- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_4$ R	577.4 → 925.7		
ApoB48	LSQLQTYMI	549.1 → 132.2	25/25 V	$y_1^+$
ApoB48 (IS)	LSQLQTYM- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ I	552.6 → 139.2		
ApoB100	ATGVLYDYVNK	622.4 → 915.6	34/23 V	$y_7^+$
ApoB100 (IS)	ATGVLYDYVN- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$ K	626.4 → 923.6		
ApoC-I	TPDVSSALDK	517.4 → 466.8	40/23 V	$y_9^+$
ApoC-I (IS)	TPDVSSALD- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$ K	621.4 → 470.8		
ApoC-II	TAAQNLYEK	519.7 → 865.7	35/20 V	$y_7^+$
ApoC-II (IS)	TAAQNLYE- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$ K	523.7 → 873.7		
ApoC-III	GWVTDGFSSLK	599.2 → 854.8	30/22 V	$y_8^+$
ApoC-III (IS)	GWVTDGFSSL- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$ K	603.2 → 862.8		
ApoC-IV	ELLETVVNR	537.1 → 588.4	40/25 V	$y_5^+$
ApoC-IV (IS)	ELLETVVN- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_4$ R	542.1 → 598.4		
ApoD	VLNQELR	436.7 → 659.5	25/16 V	$y_5^+$
ApoD (IS)	VLNQEL- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_4$ R	441.7 → 669.5		
ApoE	LGPLVEQGR	484.8 → 588.3	25/30	$y_5^+$
ApoE (IS)	LGPLVEQG- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_4$ R	489.8 → 598.3		
ApoE2	C(+57)LAVYQAGAR	555.2 → 835.7	40/22 V	$y_8^+$
ApoE2 (IS)	C(+57)LAVYQAGA- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_4$ R	560.2 → 845.7		

**Supplemental Table S4 – Continued, end.**

Apo	Sequence	MRM (m/z)	Cone/Collision	Fragment
ApoE4	LGADMEDVR	503.6 → 892.6	35/20 V	y <sub>8</sub> <sup>+</sup>
ApoE4 (IS)	LGADMEDV-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	508.6 → 902.6		
ApoE2/E3	LGADMEDVC(+57)GR	612.0 → 735.6	35/20 V	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
ApoE2/E3 (IS)	LGADMEDVC(+57)G-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	617.0 → 745.6		
ApoE3/E4	LAVYQAGAR	475.0 → 764.7	40/22 V	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoE3/E4 (IS)	LAVYQAGA-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	480.0 → 774.7		
ApoF	SGVQQLIQYYQDQK	567.1 → 613.2	35/20 V	b <sub>6</sub> <sup>+</sup>
ApoF (IS)	SGVQQLIQYYQDQ-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	569.2 → 613.2		
ApoH	ATVVYQGER	512.2 → 652.5	30/19 V	y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoH (IS)	ATVVYQGE-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	517.2 → 662.5		
ApoJ	ELDESLQVAER	645.2 → 602.4	25/22 V	y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoJ (IS)	ELDESLQVAE-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	650.2 → 612.4		
ApoL1	VAQELEEK	473.5 → 775.5	30/18 V	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
ApoL1 (IS)	VAQELEE-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	477.5 → 783.5		
ApoL1-G0	LNILNNNYK	554.1 → 766.6	30/20 V	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
ApoL1-G0 (IS)	LNILNNNY-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	558.1 → 774.6		
ApoL1-G1	LNMLNNNYK	563.0 → 897.7	30/21 V	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoL1-G1 (IS)	LNMLNNNY-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	567.0 → 905.7		
ApoL1-G2	LNILNNK	415.3 → 602.4	25/17	y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoL1-G2 (IS)	LNILNN-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	419.3 → 610.4		
ApoM	AFLLTTPR	409.3 → 599.5	30/10 V	y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoM (IS)	AFLLTTP-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	414.3 → 609.5		
Apo(a)	LFLEPTQADIALLK	786.9 → 1069.7	55/27 V	y <sub>10</sub> <sup>+</sup>
Apo(a) (IS)	LFLEPTQADIALL-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	790.8 → 1077.7		
Kr-IV <sub>2</sub>	GTYSTTVTGR	522.0 → 721.6	35/22 V	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
Kr-IV <sub>2</sub> (IS)	GTYSTTVTG-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	527.2 → 731.4		

**Supplemental Table S5. Summary of LC-HRMS conditions.**

<b>Column</b>	Aeris™ 1.7 µm, 100 × 2.1 mm, PEPTIDE XB-C18
<b>Mobile phase A</b>	0.1% formic acid in 5:95 acetonitrile:water (v/v)
<b>Mobile phase B</b>	0.1% formic acid in acetonitrile
<b>Linear gradient</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B = 1% for 1 min</li> <li>• 1% to 29% in 9 min</li> <li>• 29% to 95% in 0.5 min</li> <li>• 95% for 1 min</li> <li>• 95% to 1% in 0.5 min</li> <li>• 1% for 1.5 min</li> </ul>
<b>Flow rate</b>	350 µL/min
<b>Injection volume</b>	30 µL
<b>Column temperature</b>	60 °C
<b>Polarity</b>	Positive HESI mode
<b>Capillary voltage</b>	3 kV
<b>Sheath gas flow rate</b>	48.75
<b>Aux gas flow rate</b>	11.88
<b>Capillary temperature</b>	250 °C
<b>Desolvation temperature</b>	400 °C
<b>Desolvation gas</b>	N <sub>2</sub>
<b>HCD cell gas</b>	N <sub>2</sub>
<b>Acquisition mode</b>	PRM (MS/MS)
<b>PRM transitions</b>	<i>See Supplemental Table S6</i>
<b>Normalized Collision Energy (NCE)</b>	<i>See Supplemental Table S6</i>
<b>Resolution</b>	35,000
<b>AGC target</b>	2e5
<b>Maximum IT</b>	120 ms
<b>Isolation window</b>	1.4 m/z

**Supplemental Table S6. Parallel reaction monitoring (PRM) parameters used for proteotypic peptide detection (LC-HRMS).**

Apo	Sequence	Transitions ( <i>m/z</i> )	NCE	Fragments
ApoB100	ATGVLYDYVNK	621.8219 → 1070.5517, 914.4618, 801.3777, 523.2875	28	y <sub>9</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoB100 (IS)	ATGVLYDYVN-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	625.8290 → 1078.5659, 922.4760, 809.3919, 531.3017		y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Apo(a)	LFLEPTQADIALLK	786.4558 → 1069.6252, 743.4662, 557.4021, 444,3180	28	y <sub>10</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
Apo(a) (IS)	LFLEPTQADIALL-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	790.4629 → 1077.6394, 751.4804, 565.4163, 452.3322		y <sub>5</sub> <sup>+</sup> y <sub>4</sub> <sup>+</sup>
ApoE	LGPLVEQGR	484.7798 → 701.3941, 588.3100, 489.2416, 360.1990	28	y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoE (IS)	LGPLVEQG-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	489.7840 → 711.4023, 598.3183, 499.2499, 370.2073		y <sub>4</sub> <sup>+</sup> y <sub>3</sub> <sup>+</sup>
ApoE2	(C)LAVYQAGAR	554.7820 → 835.4421, 764.4050, 665.3365, 502.2732	28	y <sub>8</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoE2 (IS)	(C)LAVYQAGA-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	559.7862 → 845.4503, 774.4132, 675.3448, 512.2815		y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoE4	LGADMEDVR	503.2371 → 892.3829, 835.3614, 764.3243, 649.2974	28	y <sub>8</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoE4 (IS)	LGADMEDV-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	508.2413 → 902.3912, 845.3697, 774.3326, 659.3057		y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoE2/E3	LGADMEV(C)GR	611.7632 → 981.3764, 866.3495, 735.3090, 491.2395	28	y <sub>8</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoE2/3 (IS)	LGADMEV(C)G-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	616.7673 → 991.3847, 876/3578, 745.3173, 501.2477		y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>4</sub> <sup>+</sup>
ApoE3/E4	LAVYQAGAR	474.7667 → 764.4050, 665.3365, 502.2732, 374.2146	28	y <sub>7</sub> <sup>+</sup> y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
ApoE3/E4 (IS)	LAVYQAGA-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	479.7708 → 774.4132, 675.3448, 512.2815, 384.2229		y <sub>5</sub> <sup>+</sup> y <sub>4</sub> <sup>+</sup>

NCE: Normalized Collision Energy; (C): alkylated cysteine with a mass shift of +57.0214.

**Supplemental Table S7. Linearity of the LC-MS/MS assay ( $n = 8$ , 4 distinct experiments).**

<b>Apolipoprotein</b>	<b>Slope</b>	<b>Intercept (y)</b>	<b>Mean R<sup>2</sup></b>	<b>Equation</b>
ApoA-I	0.15 to 0.16	0.006 to 0.320	0.993	$y = 0.16x + 0.16$
ApoA-II	0.12 to 0.13	-0.043 to 0.097	0.992	$y = 0.13x + 0.03$
ApoA-IV	0.15 to 0.16	-0.090 to 0.082	0.992	$y = 0.16x - 0.003$
ApoA-V	0.37 to 0.39	-0.004 to 0.005	0.998	$y = 0.38x + 0.0004$
ApoB48	0.26 to 0.31	-0.007 to 0.014	0.976	$y = 0.28x + 0.004$
ApoB100	0.27 to 0.28	-0.037 to 0.022	0.992	$y = 0.27x - 0.007$
ApoC-I	0.33 to 0.36	-0.039 to 0.023	0.980	$y = 0.34x - 0.008$
ApoC-II	0.26 to 0.27	-0.086 to 0.105	0.987	$y = 0.27x + 0.009$
ApoC-III	0.32 to 0.33	-0.198 to -0.017	0.992	$y = 0.33x - 0.11$
ApoC-IV	0.02 to 0.03	-0.009 to 0.001	0.967	$y = 0.028x - 0.004$
ApoD	0.39 to 0.40	-0.020 to 0.03	0.998	$y = 0.39x + 0.004$
ApoE	0.53 to 0.55	-0.045 to 0.052	0.995	$y = 0.54x + 0.003$
ApoE2	0.43 to 0.47	-0.081 to 0.086	0.988	$y = 0.45x + 0.003$
ApoE4	0.31 to 0.33	-0.135 to -0.015	0.993	$y = 0.32x - 0.075$
ApoE2/E3	0.46 to 0.53	-0.202 to 0.088	0.986	$y = 0.50x - 0.057$
ApoE3/E4	0.24 to 0.28	-0.082 to 0.068	0.985	$y = 0.26x - 0.007$
ApoF	0.14 to 0.15	-0.029 to 0.009	0.975	$y = 0.14x - 0.01$
ApoH	0.35 to 0.38	-0.033 to 0.058	0.989	$y = 0.36x + 0.013$
ApoJ	0.39 to 0.44	-0.086 to 0.110	0.966	$y = 0.42x + 0.012$
ApoL1	0.07 to 0.08	-0.013 to -0.001	0.987	$y = 0.07x - 0.007$
ApoL1 (G0)	0.11 to 0.12	-0.034 to 0.011	0.992	$y = 0.12x - 0.012$
ApoL1 (G1)	0.22 to 0.24	-0.023 to 0.001	0.989	$y = 0.23x - 0.011$
ApoL1 (G2)	0.09 to 0.10	-0.043 to -0.009	0.993	$y = 0.10x - 0.026$
ApoM	0.18 to 0.19	-0.022 to 0.048	0.993	$y = 0.19x + 0.013$
Apo(a)	0.41 to 0.43	-0.011 to -0.003	0.993	$y = 0.42x - 0.007$
Apo(a) Kr-IV <sub>2</sub>	0.37 to 0.40	-0.126 to 0.173	0.988	$y = 0.39x + 0.024$

**Supplemental Table S8. LC-MS/MS validation and repeatability. Assay accuracy was expressed by the mean bias between the theoretical and the measured concentration (n = 6 × 4 per level). Intra-assay and inter-assay imprecisions were expressed by the coefficients of variation (CVs) obtained at each QC level (n = 6 × 4 per level).**

Parameters	A-I	A-II	A-IV	A-V	B48	B100	C-I	C-II	C-III	C-IV	D	F	H
Accuracy													
LQC	2.1	-5.1	-11.3	5.1	6.4	11.2	12.1	-4.3	1.1	8.3	3.1	10.2	2.1
MQC	-3.1	8.2	-7.3	1.2	-7.2	2.3	-6.3	-6.1	2.1	-6.4	4.2	11.2	-4.3
HQC	-4.7	3.4	-6.9	3.8	3.2	-6.4	0.7	-0.1	-2.1	-2.4	2.1	5.3	-2.1
Intra-assay													
LQC	8.2	9.1	13.4	4	5.4	8.1	3.2	3.1	5.3	12.7	2.1	14.2	4.2
MQC	4.1	3.7	12.1	5.3	5.1	5.2	4.1	4.9	6.1	11.2	3.1	10.1	5.3
HQC	2.1	1.5	8.9	6.2	6.2	3.2	7.1	2.1	1.8	9.7	3.8	7.3	4.1
Inter-assay													
LQC	9.2	10.1	12.4	8	9.4	7.1	5.2	6.1	12.3	13.7	4.1	12.2	10.2
MQC	6.1	5.4	13.3	12.1	6.9	9.8	6	8	9.2	12.1	6.3	12.1	7.5
HQC	6.7	8.3	10.1	11.1	12.3	10.1	8.3	4.3	4.2	10.1	12.1	11.2	7.4

LQC, low-concentration quality control; MQC, middle-concentration quality control; HQC, high-concentration quality control.

**Supplemental Table S8. Continued, end.**

Parameters	J	L1	L1-G0	L1-G1	L1-G2	M	E	E2	E4	E2/E3	E3/E4	(a)	Kr-IV2
Accuracy													
LQC	12.1	10.1	-13.4	-8.3	-14.8	2.3	5.2	10.1	-3.1	-4.5	-12.1	-2.1	10.1
MQC	11.2	-10.1	6.4	3.2	-3.2	0.4	8.4	8.3	-5.3	3.9	-10.2	2.7	6.2
HQC	10.1	-9.4	-3.9	4.8	-9.3	3.1	9.1	-2.2	-7.2	2.1	-8.3	1.4	2.1
Intra-assay													
LQC	12.1	13.7	12.1	10.4	9.1	3.1	2.1	6.7	7.4	8.1	5.9	4.1	9.2
MQC	10.3	14.1	10.1	7.4	5.4	2.1	1.7	5.6	7.8	7.2	8.9	5.2	6.1
HQC	6.9	11.1	8.4	7.9	7.8	4.2	2.9	4.2	6.3	5.3	9.2	3.2	7.5
Inter-assay													
LQC	13.1	13.7	14.3	13.9	12.1	5.1	7.1	9.7	5.4	10.1	9.9	5.1	12.2
MQC	11.4	12.1	11.3	12.3	13.2	5.3	6.2	7.3	9.3	9.1	10.1	8.3	7.1
HQC	8.3	13.1	9.8	10.4	9.5	7.3	5.3	7.3	7.3	6.2	10.1	4.3	9.9

LQC, low-concentration quality control; MQC, middle-concentration quality control; HQC, high-concentration quality control.

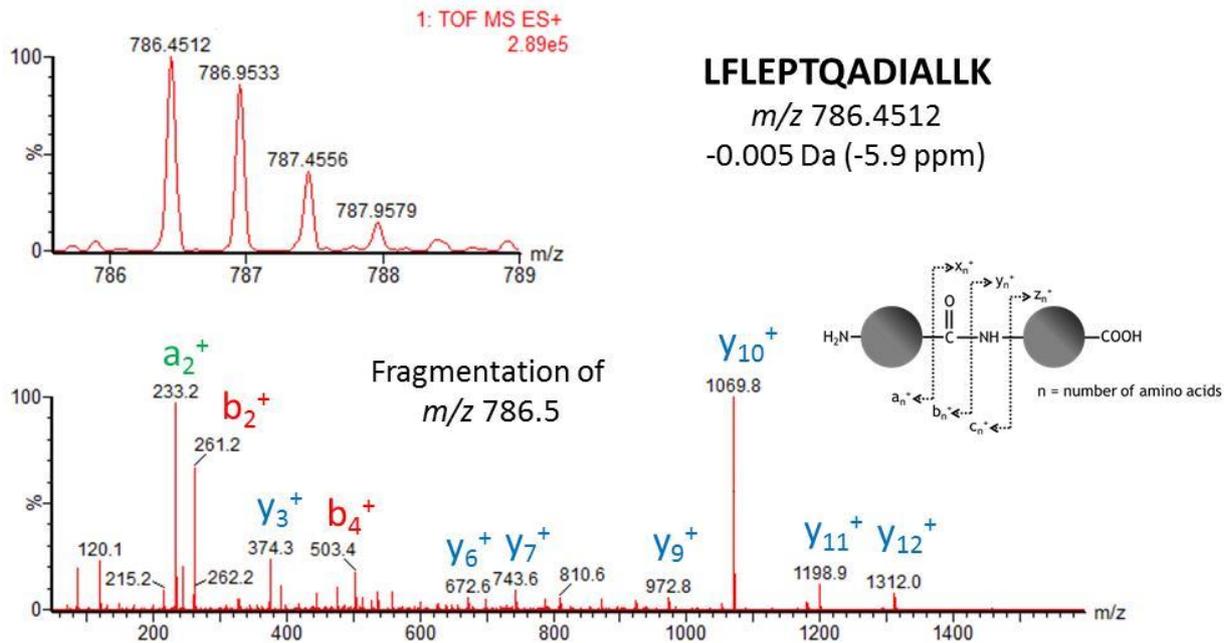
**Supplemental Table S9. Overview of apolipoprotein stabilities for LC-MS/MS analyses (*n* = 16 per condition).**

Apolipoprotein	EDTA Plasma						Serum		Li-Heparin Plasma		Citrate Plasma	
	24 h (RT)	1 week (4 °C)	3 months (-20 °C)	12 months (-80 °C)	18 months (-80 °C)	5 FTCs (-80 °C)	12 months (-80 °C)	5 FTCs (-80 °C)	12 months (-80 °C)	5 FTCs (-80 °C)	12 months (-80 °C)	5 FTCs (-80 °C)
ApoA-I	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ApoA-II	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ApoA-IV	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗
ApoA-V	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓
ApoB48	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ApoB100	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ApoC-I	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ApoC-II	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ApoC-III	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
ApoC-IV	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓
ApoD	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ApoE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓
ApoF	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✗
ApoH	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ApoJ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓
ApoL1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✗
ApoM	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Apo(a)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✗

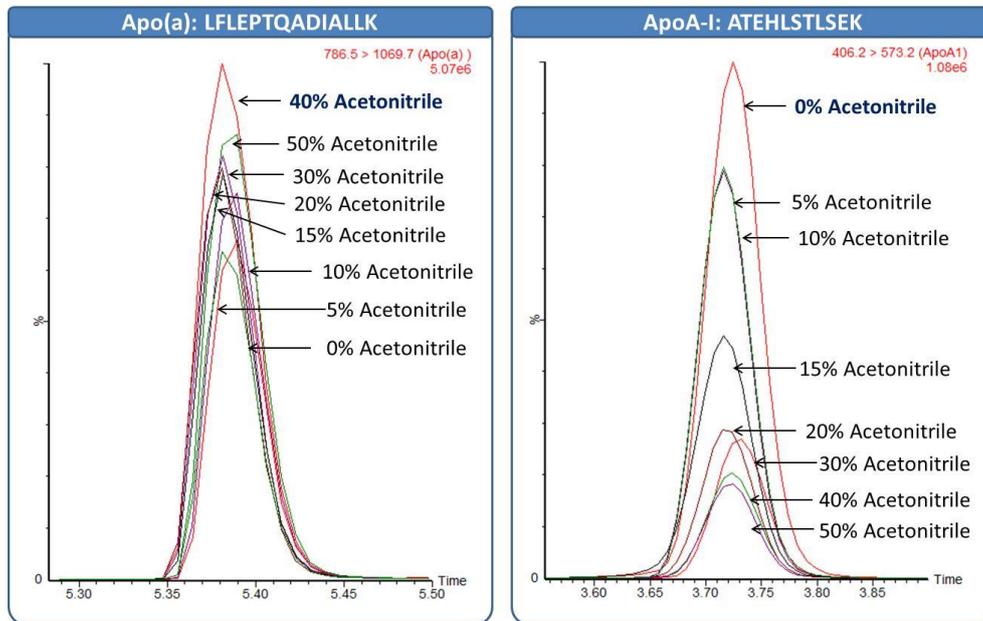
FTCs, freeze/thaw cycles; RT, room temperature (22 ± 2 °C). ✓: stable (recovery ranging from 85% to 115%); ✗: unstable (recovery <85%).

## SUPPLEMENTAL FIGURES

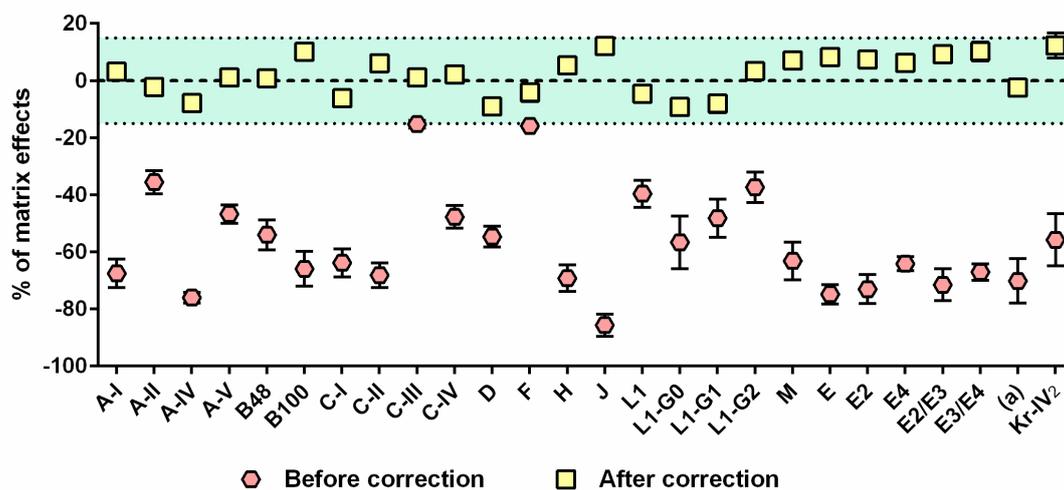
**Supplemental Figure S1. Characterization of the apo(a) peptide signature (LFLEPTQADIALLK) by LC-HRMS. (A) Precursor ion spectrum and (B) Product ion spectrum obtained after fragmentation of the precursor ion at  $m/z$  786.5.**



**Supplemental Figure S2. Optimization of the solvent composition to reconstitute dried samples before LC-MS/MS analysis.** Representative chromatograms of apo(a) (LFLEPTQADIALLK) and apoA-I (ATEHLSTLSEK) proteotypic peptides after reconstitution in various concentrations of acetonitrile in water with 0.1% formic acid.

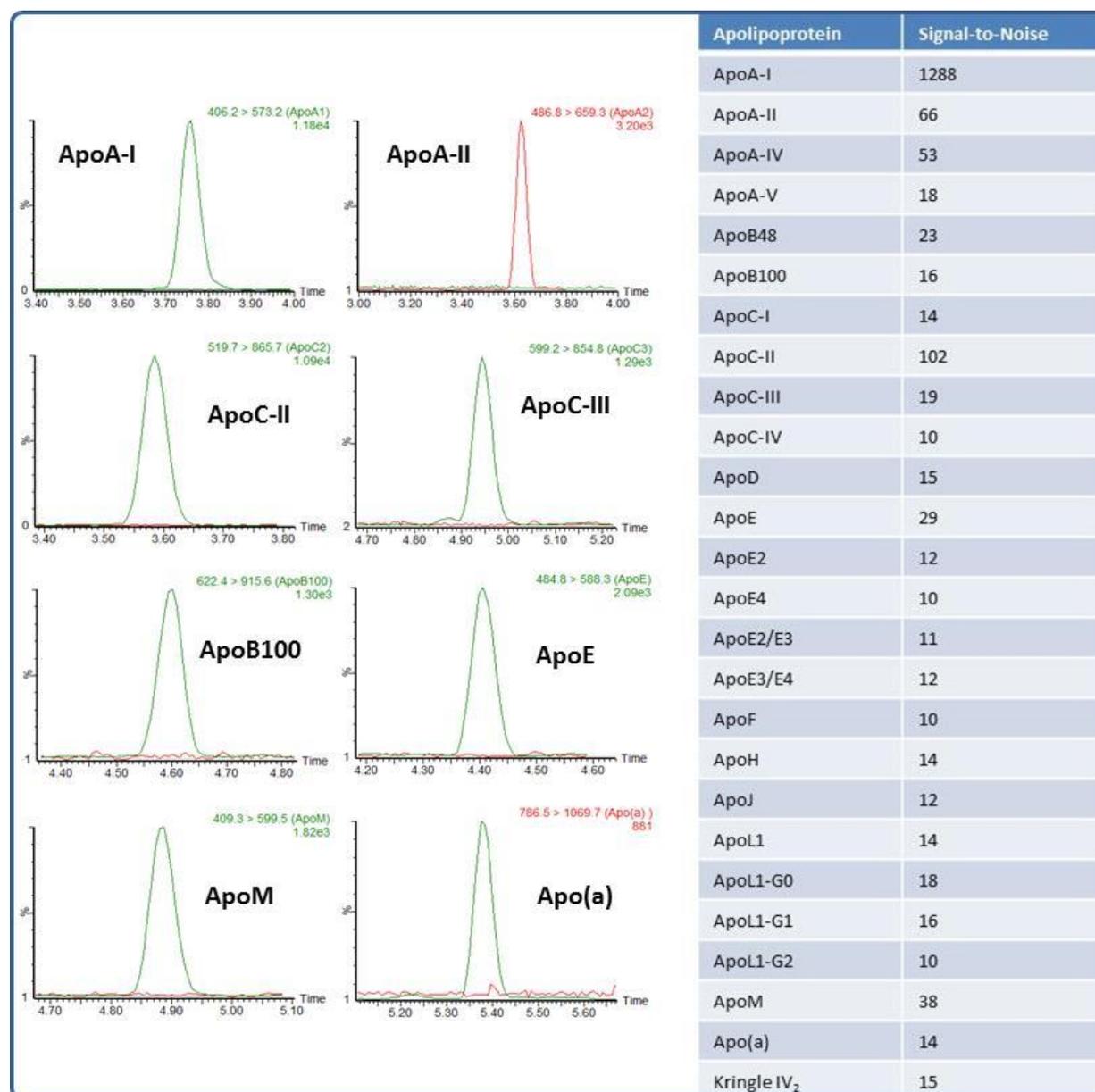


**Supplemental Figure S3. Determination of matrix effects in bovine plasma before and after correction with labeled internal standards (ISs).** Values are means  $\pm$  SD ( $n = 18$ , 6 replicates per concentration level, 3 concentration levels). The green area indicates our limit of acceptance ( $\pm 15\%$ ).



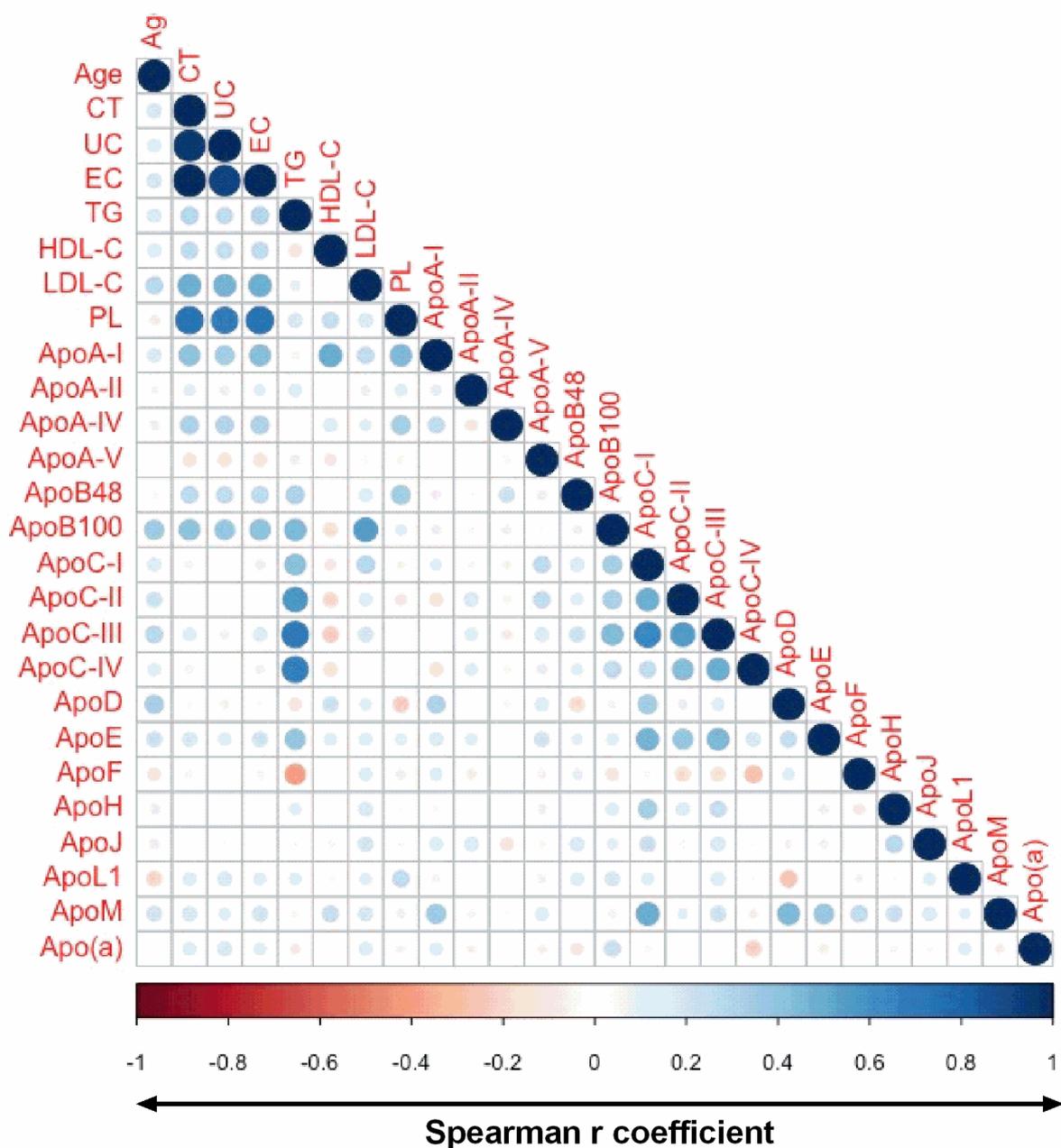
**Supplemental Figure S4. Lower limit of quantification (LLOQ) of the assay.**

Representative chromatograms obtained in spiked and unspiked bovine plasma samples with proteotypic peptides at their respective LLOQ and the signal-to-noise ratios measured for each peptide (peak-to-peak calculation).



**Supplemental Figure S5. Overview of Spearman correlations between apolipoproteins and the main lipid parameters.**

The Spearman’s rank correlation coefficient was computed with the R software package (R Core Team, 2019) and displayed with the “corrplot package.” TC, total cholesterol; UC, unesterified cholesterol; EC, esterified cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; PL, phospholipid. The circle size indicates the statistical significance. Only significant correlations are presented ( $p < 0.05$ ).



## **Discussion et perspectives**

Traditionnellement, la quantification des apolipoprotéines s'effectue par des méthodes immuno-chimiques qui présentent de nombreux inconvénients. Aujourd'hui, seuls les kits de dosage des apolipoprotéines majeures telles que l'apoB100 et apoA-I, et dans une moindre mesure l'apoE et l'apoC-III, ont été standardisés et assurent une bonne reproductibilité des mesures en clinique (van den Broek et al., 2016). Nous avons décrit ici une méthode d'analyse des apolipoprotéines par LC-MS/MS en utilisant un système triple quadripôle qui offre une excellente alternative aux méthodes immuno-chimiques, d'une part, en permettant une quantification absolue et, d'autre part, en fournissant des informations supplémentaires telles que des modifications d'un ou deux acides aminés sur la séquence protéique qui ne peuvent pas être détectées par les kits immuno-chimiques classiques.

L'optimisation du protocole a permis de mettre en évidence des vitesses de digestion tryptique variables selon les apolipoprotéines. Nous avons optimisé la température et le temps de digestion pour l'ensemble des apolipoprotéines. Tous les tests réalisés pour l'optimisation des autres étapes nécessaires à la digestion des protéines, incluant la réduction et l'alkylation des ponts disulfures, ont permis de confirmer les instructions préconisées par le fournisseur. Les autres étapes du protocole de préparation des échantillons telles que l'extraction des peptides sur phases solide/liquide (SPE) ou la reprise des échantillons par une solution adéquate après leur séchage, a permis de valider les conditions expérimentales préalablement définies (Croyal et al., 2016). Après optimisation, notre protocole expérimental a montré d'excellents résultats en termes de linéarité (coefficient de détermination,  $R^2 > 0,967$ ), de justesse (biais  $< \pm 15\%$ ), de répétabilité et de reproductibilité (coefficients de variation  $< 15\%$ ). La comparaison des valeurs obtenues par différentes méthodes n'a montré aucune différence significative entre la LC-MS/MS et les autres techniques incluant la néphélométrie, l'ELISA et la LC-HRMS (système quadripôle-Orbitrap®). Par ailleurs, la LC-MS/MS et la LC-HRMS ont montré une excellente reproductibilité pour le dosage de l'apo(a) ( $p < 0,0001$  ;  $r = 0,96$ ) avec seulement trois valeurs aberrantes sur 160, correspondant à trois plasma opalescents. La LC-MS/MS possède aussi une bonne capacité de phénotypage en identifiant notamment les isoformes majoritaires de l'apoE (apoE2, apoE3 et apoE4) et de l'apoL1 (G0, G1, G2). Bien que la LC-MS/MS ne permette pas de déterminer la taille exacte de chaque isoforme d'apo(a), en particulier pour les individus avec deux isoformes circulantes, les tailles moyennes obtenues par LC-MS/MS et les tailles exactes obtenues par Western Blot étaient relativement proches. Cela suggère que l'estimation

de la taille de l'apo(a) par LC-MS/MS est fiable et interprétable en recherche fondamentale. Enfin, nous avons établi une durée de conservation possible des échantillons de plasma EDTA jusqu'à 18 mois (-80°C) et validé leur stabilité après cinq cycles de congélation/décongélation. Cette observation contraste avec les instructions des kits immuno-chimiques qui recommandent d'effectuer les dosages sur du plasma frais ou ayant subi une seule décongélation. Cette donnée est particulièrement intéressante pour considérer l'analyse de grandes cohortes où les patients sont souvent inclus sur plusieurs années.

Cette méthode présente néanmoins quelques limites. Une simple modification chimique induisant un changement de masse du peptide signature (oxydation des méthionines, substitution d'un acide aminé, modifications post-traductionnelles), sa détection deviendra alors impossible par le spectromètre de masse. C'est pourquoi plusieurs peptides protéotypiques d'une même protéine devraient être utilisés pour éviter ces erreurs. Par ailleurs, l'étape de digestion enzymatique dans la préparation des échantillons est à l'origine d'importantes variations puisque les protéines doivent être entièrement digérées pour pouvoir être correctement quantifiées (Walmsley et al., 2013). Des standards avec des concentrations connues en apolipoprotéines devraient systématiquement être employés comme contrôle qualité. La qualité des échantillons influence également de façon très importante la quantification des apolipoprotéines (effets matrices). C'est pourquoi l'utilisation de standards internes enrichis en isotopes stables ainsi que des étapes de lavages sont indispensables (Beynon et al., 2005). Par ailleurs, la méthode de prélèvement sanguin doit être clairement définie puisqu'une grande hétérogénéité de mesure a été observée entre les sérums et les différents plasmas pour lesquels l'EDTA, l'héparine de lithium ou le citrate ont été choisis comme anticoagulant.

Bien que des efforts supplémentaires soient nécessaires à la normalisation des protocoles impliquant la spectrométrie de masse, cette approche offre de nombreux avantages. Elle permet en un temps réduit et à partir de moins de 50 µL d'échantillon de générer une grande quantité de données utiles dans le domaine du métabolisme lipidique et la prévention des maladies cardiovasculaires (Croyal, 2017).

Un autre avantage majeur de la LC-MS/MS pour l'étude du métabolisme des lipoprotéines réside dans la possibilité de réaliser des analyses de flux métaboliques avec des traceurs marqués par des isotopes stables. Ces études permettent d'obtenir des informations précieuses sur le métabolisme des apolipoprotéines (Barrett et al., 2006). La méthode présentée ici

impliquant la sélection de peptides porteurs de leucine, elle est donc directement transposable à des études de flux cinétiques utilisant la  $^2\text{H}_3$ -leucine comme traceur isotopique. Nous avons ici confirmé que les concentrations en apoE, au cœur du second objectif de cette thèse, étaient modulées en fonction des phénotypes possibles en apoE. Nous avons donc naturellement transposé notre méthode LC-MS/MS pour l'étude dynamique des différentes isoformes apoE2, apoE3 et apoE4 afin d'apporter quelques éléments de réponses quant à ces modulations.

## Article 2

### **Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study**

**Blanchard V**, Ramin-Mangata S, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Durand M, Chemello K, Nativel B, Flet L, Chétiveaux M, Jacobi D, Bard J-M, Ouguerram K, Lambert G, Krempf M and Croyal M.

*J Lipid Res.* **2018** May;59(5):892-900.

#### Résumé

L'apoE joue un rôle central dans le métabolisme lipidique. Elle est présente dans toutes les classes de lipoprotéines à l'exception des LDL et est fortement impliquée dans la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons, VLDL, IDL) en tant que ligand du LDLR, du LRP ou de l'HSPG. Chez l'Homme, l'apoE présente trois isoformes majoritaires qui se distinguent par la présence d'acides aminés différents aux positions 130 et 176 avec deux cystéines pour l'apoE2, deux arginines pour l'apoE4, et respectivement une cystéine et une arginine pour l'apoE3, considérée comme l'isoforme commune puisqu'elle est retrouvée chez 50 à 90% des individus (Marais, 2019; Mahley, 2016). L'occurrence de l'isoforme apoE2, quant à elle, est comprise entre 1 et 15% de la population générale et présente une affinité presque nulle pour le LDLR. A l'inverse, l'apoE4 est présente dans 5 à 35% des individus et a une affinité plus forte pour le LDLR par rapport à l'apoE3 (Mahley, 2016). Les concentrations plasmatiques en apoE sont étroitement liées aux six phénotypes d'apoE possibles. Les porteurs d'au moins une isoforme d'apoE2 ou d'une isoforme d'apoE4 présentent des taux d'apoE plasmatiques respectivement supérieurs et inférieurs aux homozygotes pour l'apoE3 (Marais, 2019; Martínez-Morillo et al., 2014) mais les mécanismes sous-jacents de ces différences sont encore inconnus.

Nous avons transposé ici notre méthode LC-MS/MS utilisée pour la quantification spécifique des isoformes de l'apoE à la mesure de leurs enrichissements isotopiques dans un protocole cinétique impliquant la  $^2\text{H}_3$ -leucine comme traceur. La mesure de ces enrichissements nous a

permis d'investiguer les flux métaboliques et la distribution des trois isoformes de l'apoE entre les différentes classes de lipoprotéines. Les concentrations et les enrichissements des isoformes d'apoE ont été mesurés dans le plasma et dans les fractions lipoprotéiques de neuf patients atteints d'hypertriglycéridémie et présentant les phénotypes E2/E3, E3/E3 et E3/E4 (n = 3 pour chaque phénotype). Chacun de ces patients avait reçu à jeun une injection constante de <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine (10 μmol/kg/h) pendant 14 heures. Les prélèvements sanguins ont été réalisés régulièrement pendant cette période d'infusion et les lipoprotéines ont été séparées du plasma par ultracentrifugation séquentielle.

Après modélisation des courbes cinétiques d'enrichissement, nous avons montré que les différences de concentrations des isoformes d'apoE pourraient s'expliquer en partie par leurs cinétiques, avec l'apoE2 présentant un taux de catabolisme réduit et l'apoE4 un taux de production diminué, par rapport à l'apoE3. L'étude de la distribution des isoformes dans les différentes classes de lipoprotéines a révélé que l'apoE3 et l'apoE4 étaient préférentiellement associées aux lipoprotéines à apoB100 alors que l'apoE2 était retrouvée majoritairement dans les HDL. Les vitesses de renouvellement des particules à apoB100 (VLDL, IDL) étant plus rapides que celles des HDL, cette différence de distribution pourrait également expliquer les écarts de concentrations observés en fonction des phénotypes liés aux isoformes de l'apoE.



Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2018/03/14/jlr.P083576.DC1.html>

## patient-oriented and epidemiological research

# Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study<sup>5</sup>

Valentin Blanchard,<sup>\*,†</sup> Stéphane Ramin-Mangata,<sup>†</sup> Stéphanie Billon-Crossouard,<sup>\*,§</sup> Audrey Aguesse,<sup>\*,§</sup> Manon Durand,<sup>\*,\*\*</sup> Kevin Chemello,<sup>†</sup> Brice Nativel,<sup>†</sup> Laurent Flet,<sup>††</sup> Maud Chétiveaux,<sup>\*</sup> David Jacobi,<sup>\*,§§</sup> Jean-Marie Bard,<sup>\*,\*\*\*</sup> Khadija Ouguerram,<sup>\*,§</sup> Gilles Lambert,<sup>†</sup> Michel Krempf,<sup>\*,§,§§</sup> and Mikael Croyal<sup>1,\*§</sup>

CRNHO,<sup>\*</sup> West Human Nutrition Research Center, F-44000 Nantes, France; INSERM, UMR 1188 DÉTROIT,<sup>†</sup> University of La Réunion, F-97490 Sainte Clotilde, France; INRA, UMR 1280 PhAN,<sup>§</sup> F-44000 Nantes, France; L'institut du Thorax,<sup>\*\*</sup> INSERM, CNRS, UNIV Nantes, F-44000 Nantes, France; Pharmacy Department,<sup>††</sup> Nantes University Hospital, F-44093 Nantes, France; L'institut du Thorax,<sup>§§</sup> CHU Nantes, F-44093 Nantes, France; and University of Nantes,<sup>\*\*\*</sup> Mer, Molécules, Santé (MMS) - EA 2160 and Institut Universitaire Mer et Littoral (IUML) - FR3473 CNRS, F-44000 Nantes, France, and Department of Biopathology, Institute of Cancer and Oncology, F-44800 Saint-Herblain, France

ORCID ID: 0000-0003-0058-6462 (K.O.)

**Abstract** Human apoE exhibits three major isoforms (apoE2, apoE3, and apoE4) corresponding to polymorphism in the *APOE* gene. Total plasma apoE concentrations are closely related to these isoforms, but the underlying mechanisms are unknown. We aimed to describe the kinetics of apoE individual isoforms to explore the mechanisms for variable total apoE plasma concentrations. We used LC-MS/MS to discriminate between isoforms by identifying specific peptide sequences in subjects (three E2/E3, three E3/E3, and three E3/E4 phenotypes) who received a primed constant infusion of <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine for 14 h. apoE concentrations and leucine enrichments were measured hourly in plasma. Concentrations of apoE2 were higher than apoE3, and concentrations of apoE4 were lower than apoE3. There was no difference between apoE3 and apoE4 catabolic rates and between apoE2 and apoE3 production rates (PRs), but apoE2 catabolic rates and apoE4 PRs were lower. The mechanisms leading to the difference in total plasma apoE concentrations are therefore related to contrasted kinetics of the isoforms. Production or catabolic rates are differently affected according to the specific isoforms. **5** On these grounds, studies on the regulation of the involved biochemical pathways and the impact of pathological environments are now warranted.—Blanchard, V., S. Ramin-Mangata, S. Billon-Crossouard, A. Aguesse, M. Durand, K. Chemello, B. Nativel, L. Flet, M. Chétiveaux, D. Jacobi, J.-M. Bard, K. Ouguerram, G. Lambert, M. Krempf, and M. Croyal. Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study. *J. Lipid Res.* 2018. 59: 892–900.

**Supplementary key words** peptide • liquid chromatography • tandem mass spectrometry • stable isotope tracers • lipoprotein/kinetics • lipoprotein/metabolism

apoE plays a key role in lipoprotein metabolism (especially triglyceride-rich lipoproteins) and as a ligand for the LDL receptor (LDLR), the LDLR-related protein (LRP), and heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) (1–3). Human apoE is a 299 amino acid protein mostly expressed by the liver and the brain. The *APOE* gene is localized on chromosome 19 and exhibits three common alleles ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , and  $\epsilon 4$ ) coding for three isoforms (apoE2, apoE3, and apoE4) that differ by single cysteine (C)-arginine (R) substitutions. apoE3 (C<sub>112</sub>, R<sub>158</sub>) is the most common isoform in 50–90% of the population. apoE2 (C<sub>112</sub>, C<sub>158</sub>) and apoE4 (R<sub>112</sub>, R<sub>158</sub>) are less frequent and found in 1–15% and 5–35% of the population, respectively (1, 2). Six phenotypes are found in humans: three homozygotes (E4/E4, E3/E3, and E2/E2) and three heterozygotes (E3/E4, E2/E3, and E2/E4) (2).

The LDLR, LRP, and HSPG binding functions of apoE2 are reduced compared with apoE3. This may lead, in the homozygote E2/E2 state, to type III combined hyperlipoproteinemia and increased CVD risk. In contrast, apoE4 and apoE3 show similar affinities for those receptors.

Abbreviations: FCR, fractional catabolic rate; FPLC, fast protein LC; FSR, fractional synthetic rate; HSPG, heparan sulfate proteoglycan; IR, isotope ratio; IS, internal standard; LDLR, LDL receptor; LRP, LDL receptor-related protein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin kexin type 9; PR, production rate; TRL, triglyceride-rich lipoprotein.

<sup>1</sup>This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01216956.

<sup>5</sup>To whom correspondence should be addressed.

e-mail: mikael.croyal@univ-nantes.fr

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

Copyright © 2018 Blanchard et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. This article is available online at <http://www.jlr.org>

ASBMB

JOURNAL OF LIPID RESEARCH



This work was supported by an Allocation de Recherche Chaire Mixte (Inserm-Université) and Agence Nationale de la Recherche Program Grant ANR-16-RHUS-0007 CHOPIN to G.L. Additional financial support was provided by the Biogenouest CORSAIRE core facility. The authors declare no competing financial interest.

Manuscript received 17 January 2018 and in revised form 9 March 2018.

Published, JLR Papers in Press, March 14, 2018  
 DOI <https://doi.org/10.1194/jlr.P083576>

apoE4 has been associated with increased CVD risk and also appears to be a strong genetic determinant for Alzheimer's disease (1, 3–5). apoE plasma concentrations are closely related to *APOE* genotypes. Carriers of at least one  $\epsilon 2$  or one  $\epsilon 4$  allele respectively present with higher and lower plasma apoE levels than  $\epsilon 3/\epsilon 3$  homozygotes (6–8). The mechanisms underlying these differences are still unknown.

Lipoprotein turnover can be assessed *in vivo* by measuring the incorporation of an injected tracer, usually  $^2\text{H}_3$ -leucine, in apolipoproteins over time, allowing the determination of lipoprotein kinetic parameters such as their production rates (PRs) and fractional catabolic rates (FCRs) (9). This approach has been improved by new analytical techniques involving enzymatic proteolysis and LC-MS/MS (10, 11). LC-MS/MS is a powerful tool to simultaneously quantify several plasma proteins even at low concentrations (12, 13). This technique also allows the determination of protein polymorphisms (2, 14).

An LC-MS/MS method was recently developed to quantify apoE isoforms in both human plasma and cerebrospinal fluid (2). In this study, plasma apoE2 was more abundant than apoE3, and apoE3 more abundant than apoE4 in patients with  $\epsilon 2/\epsilon 3$  and  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotypes, respectively (7). To investigate why apoE isoform concentrations differ *in vivo*, we measured the isotopic enrichment of apoE isoforms in whole plasma and in the lipoproteins to determine their kinetics in a series of  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , and  $\epsilon 3/\epsilon 4$  patients who received a primed constant infusion of  $^2\text{H}_3$ -leucine.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and apparatus

UPLC/MS-grade acetonitrile, water, methanol, and 99% formic acid were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). The  $^2\text{H}_3$ -leucine was obtained from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA). Ammonium bicarbonate was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Synthetic labeled and unlabeled peptides were purchased from Thermo Scientific Biopolymers (Darmstadt, Germany). Stock solutions of synthetic peptides were prepared at 1 mmol/l in 50% acetonitrile containing 0.1% formic acid and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. LC-MS/MS analyses were performed on a Xevo<sup>®</sup> TQD mass spectrometer with an ESI interface and an Acquity H-Class<sup>®</sup> UPLC<sup>™</sup> device (Waters Corporation, Milford, MA). Data acquisition and analyses were performed with MassLynx<sup>®</sup> and TargetLynx<sup>®</sup> software, respectively (version 4.1; Waters Corporation).

### Subjects and infusion protocol

Nine overweight male subjects (three  $\epsilon 2/\epsilon 3$ , three  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , and three  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ;  $49 \pm 11$  years old; BMI of  $29 \pm 3 \text{ kg/m}^2$ ) with hypertriglyceridemia (plasma triglycerides:  $248 \pm 70 \text{ mg/dl}$ ) were included in this study. They did not receive any treatment. After an overnight fast, each subject received an intravenous bolus of  $10 \mu\text{mol/kg}^2\text{H}_3$ -leucine immediately followed by a constant intravenous infusion at  $10 \mu\text{mol/kg/h}$  for 14 h. Blood samples were collected hourly in EDTA tubes (Venoject, Paris, France), and the plasma was separated by centrifugation at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. The Ethics Committee of Nantes

University Hospital approved the clinical protocols, and written informed consent was obtained from each subject (trial numbers: NCT01216956 and V00002CA101).

### Biochemical measurements

Cholesterol and triglyceride concentrations were measured using enzymatic kits from Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany) according to the supplier's instructions. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) concentrations were measured in plasma by enzyme-linked immunosorbent assay according to the supplier's instructions (R&D Systems, Lille, France).

### Isolation of lipoproteins

Plasma lipoprotein fractions, including VLDL, IDL, LDL, and HDL, were separated by fast protein LC (FPLC) or by sequential ultracentrifugation methods (15, 16). Total cholesterol and triglyceride contents were measured in each FPLC fraction. FPLC fractions corresponding to the same lipoprotein class were pooled. Lipoprotein fractions (2 ml for FPLC, 800  $\mu\text{l}$  for ultracentrifugation) were desalted and concentrated with 3 ml of 50 mmol/l ammonium bicarbonate buffer (pH 8) using a 5 kDa molecular mass cut-off filter for apolipoprotein enrichment measurements.

### Sample preparation and proteolytic digestion

Apolipoproteins (apoA-I, apoB100, apoC-II, apoC-III, and apoE) were analyzed in plasma, lipoprotein fractions, and concentrated lipoprotein fractions using a validated multiplexed assay involving trypsin proteolysis and the subsequent analysis of proteotypic peptides by LC-MS/MS (10). The method was updated for the quantification of apoE isoforms as described previously (2). A pool solution of unlabeled synthetic peptides (M0; Table 1) was constituted and serially diluted in water to obtain seven standard solutions ranging from 0.5 to 50  $\mu\text{mol/l}$  (apoA-I), from 0.25 to 25  $\mu\text{mol/l}$  (apoB100, apoC-II, and apoC-III), and from 0.1 to 10  $\mu\text{mol/l}$  (apoE and isoforms). Plasma, lipoprotein, and standard samples (60  $\mu\text{l}$ ) were reduced [addition of 120  $\mu\text{l}$  of ammonium bicarbonate (50 mmol/l) containing 7 mg/ml of RapidGest detergent (Waters Corporation) and incubation for 10 min at  $80^\circ\text{C}$ ; then addition of dithiothreitol (100 mmol/l, 20  $\mu\text{l}$ ) and incubation for 20 min at  $60^\circ\text{C}$ ], alkylated [addition of iodoacetamide (200 mmol/l, 20  $\mu\text{l}$ ) and incubation for 20 min at room temperature in the dark], and trypsin digested overnight [5 mg/ml in HCl (1 mmol/l, 30  $\mu\text{l}$ ) at  $37^\circ\text{C}$ ] using the ready-to-use solutions of the ProteinWorks<sup>™</sup> eXpress kit (Waters Corporation) according to the manufacturer's instructions. Labeled proteotypic peptides (Table 1) were used as internal standards (ISs) and a mixed solution of standards was added to the digestion buffer to a final concentration of 0.5  $\mu\text{mol/l}$ . After digestion, samples were cleaned using 30 mg Oasis HLB 1 cc cartridges (Waters Corporation). Cartridges were conditioned, equilibrated, loaded, washed, and eluted with methanol (1 ml), water (1 ml), samples ( $\sim 250 \mu\text{l}$ ), 5% methanol (1 ml), and 80% methanol (500  $\mu\text{l}$ ), respectively. Eluates were dried under a nitrogen stream, reconstituted with 100  $\mu\text{l}$  of 5% acetonitrile containing 0.1% formic acid, and 10  $\mu\text{l}$  were injected into the LC-MS/MS system.

### Analytical parameters

Apolipoprotein analyses were carried out by LC-MS/MS. Proteotypic peptides were separated over 9 min on an Acquity<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column (2.1  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ; Waters Corporation) held at  $60^\circ\text{C}$  with a linear gradient of mobile phase B (100% acetonitrile) in mobile phase A (5% acetonitrile), each containing 0.1%



TABLE 1. Analytical parameters used for each proteotypic peptide

Protein	Name	Peptide	Fragment	Cone/Collision (V)	MRM (m/z)
apoA-I	M0	ATEHLSTLSEK	Y <sub>10</sub> <sup>2+</sup>	25/15	406.2 → 573.2
	IS	ATEHLSTLSE-[ <sup>15</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	Y <sub>10</sub> <sup>2+</sup>	25/15	408.9 → 577.2
apoB100	M0	ATGVLYDYVVK	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	34/23	622.4 → 915.6
	M3	ATGVLYDYVVK	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	34/23	623.9 → 915.6
apoC-II	IS	ATGVLYDYVN-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	34/23	626.4 → 923.6
	M0	TAAQNLYEK	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	35/20	519.7 → 865.7
apoC-III	IS	TAAQNLYE-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	35/20	523.7 → 873.7
	M0	GWVTDGFSSLK	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	40/35	598.2 → 854.1
apoE	IS	GWVTDGFSSL-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	40/35	602.2 → 862.1
	M0	LGPLVEQGR	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup>	25/30	484.8 → 588.3
apoE2	M3	LGPLVEQGR	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup>	25/30	486.3 → 588.3
	IS	LGPLVEQG-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup>	25/30	489.8 → 598.3
apoE4	M0	[C]LAVYQAGAR	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	40/22	555.2 (527.7) → 835.7
	M3	[C]LAVYQAGAR	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	40/22	556.7 (529.3) → 835.7
apoE2/E3	IS	[C]LAVYQAGA-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	40/22	560.2 → 845.7
	M0	LGAD[M]EDVR	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	35/20	503.6 (511.6) → 892.6 (908.6)
apoE3/E4	M3	LGADMEDVR	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	35/20	505.1 (513.1) → 892.6 (908.6)
	IS	LGADMEDV-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	35/20	508.6 → 902.6
apoE2/E3	M0	LGADMEDV[C]GR	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	35/20	612.0 → 735.6
	M3	LGADMEDV[C]GR	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	35/20	613.5 → 735.6
apoE3/E4	IS	LGADMEDV[C]G-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	35/20	612.0 → 735.6
	M0	LAVYQAGAR	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	40/22	475.0 → 764.7
apoE3/E4	M3	LAVYQAGAR	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	40/22	476.5 → 764.7
	IS	LAVYQAGA-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	40/22	480.0 → 774.7

Parentheses indicate secondary transitions that may occur. [C] indicates carbamidomethyl-cysteine (+57) and [M] indicates oxidized methionine. Underlined L indicates the putative incorporation site(s) of <sup>3</sup>H<sub>3</sub>-leucine. M0, unlabeled peptide; M3, <sup>3</sup>H<sub>3</sub>-leucine labeled peptide; MRM, multiple reaction monitoring.

formic acid, at a flow rate of 600 µl/min. Mobile phase B was linearly increased from 1% to 50% for 5 min, kept constant for 1 min, returned to the initial condition over 1 min, and kept constant for 2 min before the next injection. Proteotypic peptides were then detected by the mass spectrometer with the ESI interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 3 kV; desolvation gas (N<sub>2</sub>) flow and temperature, 900 l/h and 400°C; source temperature, 150°C). The multiple reaction monitoring mode was applied for MS/MS detection as detailed in Table 1.

apoE genotype validation

apoE genotypes were confirmed by LC-MS/MS in plasma samples according to the presence of different combinations of peptides (2) and illustrated in Fig. 1: E2/E2 phenotype (LGADMEDVCGR, CLAVYQAGAR), E2/E3 phenotype (LGADMEDVCGR, CLAVYQAGAR, LAVYQAGAR), E2/E4 phenotype (LGADMEDVCGR, CLAVYQAGAR, LGADMEDVR, LAVYQAGAR), E3/E3 phenotype (LGADMEDVCGR, LAVYQAGAR), E3/E4 phenotype (LGADMEDVCGR, LAVYQAGAR, LGADMEDVR), and E4/E4 phenotype (LGADMEDVR, LAVYQAGAR).

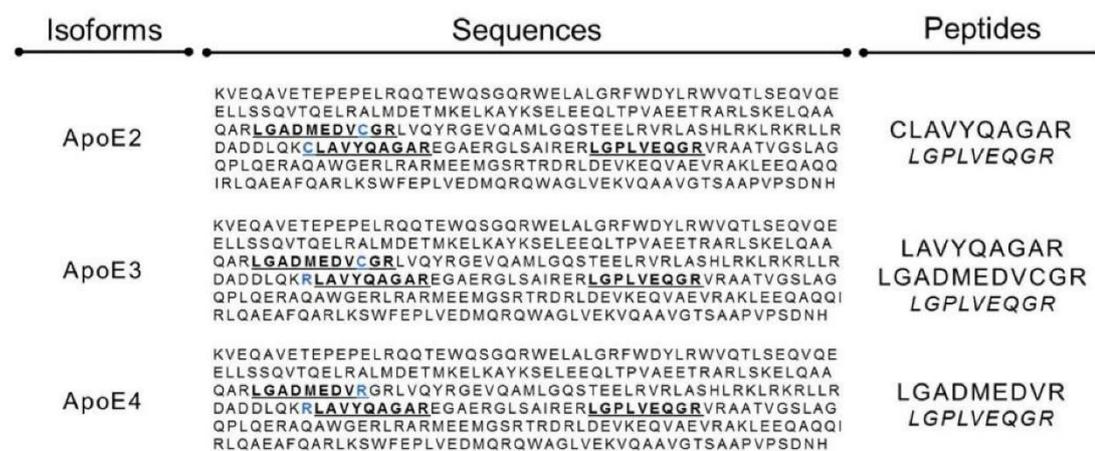


Fig. 1. Selection of signature peptides from apoE sequences for isoform analysis. Phenotype identification and apoE isoform concentrations were assessed using different combinations of peptides. Both apoE2 and apoE4 carry a single specific peptide (CLAVYQAGAR and LGADMEDVR, respectively) unlike apoE3. For enrichment measurements in heterozygous patients, LAVYQAGAR and LGADMEDVCGR were used for apoE3 kinetics in E2/E3 and E3/E4 phenotypes, respectively. In homozygous E3/E3 patients, enrichments of LAVYQAGAR and LGADMEDVCGR were averaged. Blue indicates cysteine-arginine interchanges between isoforms.

### Apolipoprotein quantification

Chromatographic peak area ratios between unlabeled peptides (M0) and their respective ISs constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves for peptide quantification. The linearity was expressed by the mean  $r^2$ , which was greater than 0.985 for all peptides (linear regression, 1/x weighting, origin excluded). Each sample was assayed three times and the coefficients of variation did not exceed 11.3% for all peptides in all samples. Apolipoprotein concentrations were expressed in micromoles per liter, assuming 1 mol of peptide equivalent to 1 mol of protein. Concentrations were then converted to their standard unit (milligrams per deciliter) assuming a molecular mass of 28,079, 512,858, 8,204, 8,765, and 34,237 g/mol for apoA-I, apoB100, apoC-II, apoC-III, and apoE, respectively (www.uniprot.org). For the quantification of apoE isoforms, specific CLAVYQAGAR and LGADMEDVVR peptides were used for apoE2 and apoE4, respectively. Unlike apoE2 and apoE4, the apoE3 isoform does not display any specific peptide. apoE3 concentration was therefore calculated by subtracting the concentrations measured for apoE2 (E2/E3 phenotype) or apoE4 (E3/E4 phenotype) from the total apoE (LGPLVEQGR) concentration. The common peptides of apoE2/E3 (LGADMEDVCGR) and apoE3/E4 (LAVYQAGAR) were used to confirm these apoE3 concentrations with acceptance criteria set at a maximum of 10% of variation between both approaches (2). Chemical modifications that might occur within some peptides were taken into account (secondary MRM transitions shown within parentheses, Table 1) and integrated to determine the exact concentrations of each apoE isoform (2).

### Enrichments of apoE isoforms

$^3\text{H}_3$ -leucine enrichments were assessed in apoE isoforms in plasma and concentrated lipoprotein fractions, as previously validated (10, 14). Enrichments were calculated as described previously from unlabeled (M0) and  $^3\text{H}_3$ -leucine-labeled (M3) peptides (10, 17). Briefly, the isotope ratio (IR), corresponding to the M3/M0 percent ratio (%), was divided by the number of leucine residues in the peptide sequence. After baseline subtraction, the IR was converted to enrichment as follows: enrichment =  $(\text{IR} \times 100) \div (100 + \text{IR})$ . Both apoE2 and apoE4 kinetics were investigated from their respective signature peptides (CLAVYQAGAR and LGADMEDVVR, respectively). To minimize variability, two peptides located in the same areas were used for apoE3 kinetics, as illustrated in Fig. 1 (LAVYQAGAR for E2/E3 phenotype, LGADMEDVCGR for E3/E4 phenotype, and the average of both LAVYQAGAR and LGADMEDVCGR for the E3/E3 phenotype). Apolipoprotein enrichment measurements were performed on three replicates for all kinetic time points: coefficients of variation did not exceed 12.6%.

### Enrichments of total apoE

Total apoE kinetics were investigated in plasma and concentrated lipoprotein fractions by the use of the common LGPLVEQGR peptide, as previously described and validated (10). Apolipoprotein enrichment measurements were performed on three replicates for all kinetic time points: coefficients of variation did not exceed 7.1%.

### Precursor pool

The  $^3\text{H}_3$ -leucine enrichments were investigated in VLDL apoB100 (10). Enrichment measurements were performed on three replicates for all kinetic time points and coefficients of variation did not exceed 5.1%.

### Kinetic parameters

Kinetic analysis was achieved using the Simulation, Analysis, and Modeling II software (SAAM II; Epsilon Group, Charlottesville, VA). The labeling of apoE nearly reached the asymptotic maximal enrichment (precursor pool), which suggested a relatively rapid turnover over the time course of the study (17). Fractional synthetic rates (FSRs) were estimated using the following mono-exponential equation: protein labeling<sub>time</sub> = protein labeling<sub>steady-state</sub>  $\times [1 - e^{-\text{FSR} \times (\text{time} - \text{delay})}]$  (17). The protein labeling at steady state (precursor pool) was assumed to be close to that of a surrogate protein with fast turnover (i.e., VLDL apoB100, supplemental Fig. S1), and the delay parameter was set adjustable (0.01–1.00 h) for calculation. As expected (fasting state), apolipoprotein pool sizes were considered constant, as no significant variation was observed in apoE concentrations during the time course of the kinetic study. PRs were calculated as the product of the FSR and the average apoE concentration by assuming a plasma volume of 4.5% of body weight. At steady-state, the FCR is equal to the FSR.

### Validation of kinetic parameters

Total apoE FCR was deduced from those of specific isoforms with the following equation:  $\text{FCR}_{\text{Total}} = [(Q_1 \times k_1) + (Q_2 \times k_2)] \div (Q_1 + Q_2)$ . Pool sizes of isoforms 1 and 2 are expressed by  $Q_1$  and  $Q_2$ , respectively, and the FCRs of isoforms 1 and 2 are expressed by  $k_1$  and  $k_2$ , respectively. Kinetic parameters of total apoE were also investigated by the use of the common LGPLVEQGR peptide (10). Kinetic parameters obtained from both approaches (i.e., sum of isoforms vs. total apoE) were then compared.

### apoE distribution within lipoproteins

Concentrations of apoE isoforms were measured in concentrated samples (60  $\mu\text{l}$ ) taking into account the concentration factor. Total apoE, apoA-I (HDL), and apoB100 (VLDL/IDL/LDL) contents were measured simultaneously.

### Statistical analyses

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The non-parametric Spearman correlation test was carried out with GraphPad Prism software (version 6.0; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) and results were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### apoE genotype validation

apoE genotypes were confirmed by LC-MS/MS in the nine subjects according to the presence or the absence of proteotypic peptides (Fig. 2). Although we used a limited number of patients, precluding adequate statistical analyses, the lipid/lipoprotein/apolipoprotein levels (Table 2) between E2/E3, E3/E3, and E3/E4 groups were similar, including the parameters PCSK9, apoB100, LDL cholesterol, triglyceride, apoC-II, and apoC-III. In contrast, apoE plasma concentrations appeared quite different between groups:  $7.2 \pm 1.1$  mg/dl for E2/E3,  $3.8 \pm 0.7$  mg/dl for E3/E3, and  $3.1 \pm 0.4$  mg/dl for E3/E4. As shown in Fig. 3, E3/E3 patients displayed nearly twice as much apoE3 ( $3.8 \pm 0.7$  mg/dl) as E2/E3 ( $2.1 \pm 0.8$  mg/dl) and E3/E4 ( $2.1 \pm 0.5$  mg/dl) patients. In E2/E3 individuals, the apoE2 plasma concentration was higher than apoE3 ( $5.1 \pm 0.3$  mg/dl vs.

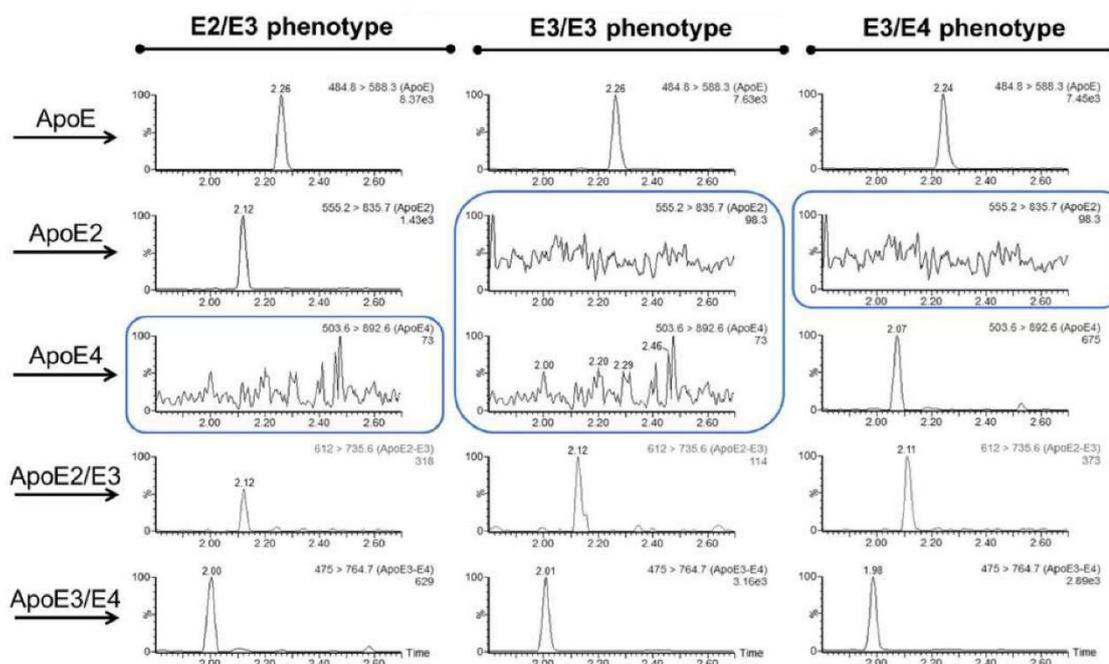


Fig. 2. Identification of apoE phenotypes by selective combination of proteotypic peptides. LC-MS/MS chromatograms obtained in plasma from representative subjects.

2.1 ± 0.8 mg/dl, respectively). In E3/E4 individuals, apoE4 plasma concentrations were lower than apoE3 (1.0 ± 0.1 mg/dl vs. 2.1 ± 0.5 mg/dl, respectively).

**Kinetics of whole plasma apoE isoforms**

Whole plasma enrichment curves of apoE3 in tracer over time were similar in E2/E3, E3/E3, and E3/E4 patients (Fig. 3). Tracer enrichments of apoE2 were nearly half of those of apoE3 measured in E2/E3 patients (Fig. 3A). Enrichment of apoE4 in tracer was slightly less than that of apoE3 measured in E3/E4 patients (Fig. 3C). Of note, we did not observe any marked analytical biases for enrichment

measurements obtained from both LAVYQAGAR and LGADMEDVCGR peptides (supplemental Fig. S2). The FCRs of apoE3 were similar in E2/E3 (1.27 ± 0.31 pool/day), E3/E3 (1.51 ± 0.35 pool/day), and E3/E4 (1.63 ± 0.32 pool/day) subjects (Fig. 4). In E3/E4 patients, the apoE4 FCR (1.67 ± 0.29 pool/day) was in the same range as that of apoE3 (1.63 ± 0.32 pool/day). In E2/E3 individuals, the apoE2 FCR (0.51 ± 0.05 pool/day) was lower than apoE3 (1.27 ± 0.31 pool/day). The PR of apoE3 was 2.40 ± 0.21 mg/kg/day in E3/E3 subjects, and about half of that in E2/E3 and E3/E4 individuals (1.36 ± 0.18 mg/kg/day and 1.52 ± 0.21 mg/kg/day, respectively), which is consistent with the presence of only one ε3 allele in heterozygotes. In E2/E3 individuals, the PR of apoE2 was found to be similar to that of apoE3 (1.16 ± 0.10 mg/kg/day vs. 1.36 ± 0.18 mg/kg/day). In sharp contrast, in E3/E4 individuals, the PR of apoE4 was twice lower than that of apoE3 (0.73 ± 0.15 mg/kg/day vs. 1.52 ± 0.21 mg/kg/day).

**Validation of kinetic data**

The enrichment curves of total apoE in tracer over time were also investigated with the common LGPLVEQGR peptide (supplemental Fig. S3). In all patients, the total plasma apoE FCR and PR were, on average, 1.48 ± 0.29 pool/day and 3.09 ± 1.35 mg/kg/day, respectively. The total apoE FCR and PR were also calculated in all patients from kinetic data obtained specifically for each isoform and related peptides. From these data, FCR and PR were, on average, 1.40 ± 0.38 pool/day and 2.54 ± 0.72 mg/kg/day,

TABLE 2. Clinical and biochemical characteristics of patients

Parameters	E2/E3	E3/E3	E3/E4
Number	3	3	3
Age (years)	51 ± 5	45 ± 15	44 ± 9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31 ± 3	27 ± 3	28 ± 4
TC (mg/dl)	193 ± 38	209 ± 28	231 ± 9
TG (mg/dl)	207 ± 43	290 ± 80	228 ± 47
HDL-C (mg/dl)	41 ± 5	41 ± 12	40 ± 5
LDL-C (mg/dl)	114 ± 28	116 ± 28	150 ± 8
apoA-I (mg/dl)	128 ± 27	139 ± 28	138 ± 14
apoB100 (mg/dl)	105 ± 18	119 ± 17	116 ± 4
apoC-II (mg/dl)	4 ± 1	4 ± 2	4 ± 2
apoC-III (mg/dl)	19 ± 5	27 ± 7	22 ± 4
apoE (mg/dl)	7.2 ± 1.1	3.8 ± 0.7	3.1 ± 0.4
PCSK9 (ng/ml)	300 ± 136	369 ± 170	298 ± 65

Values are expressed as mean ± standard deviation. TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol.

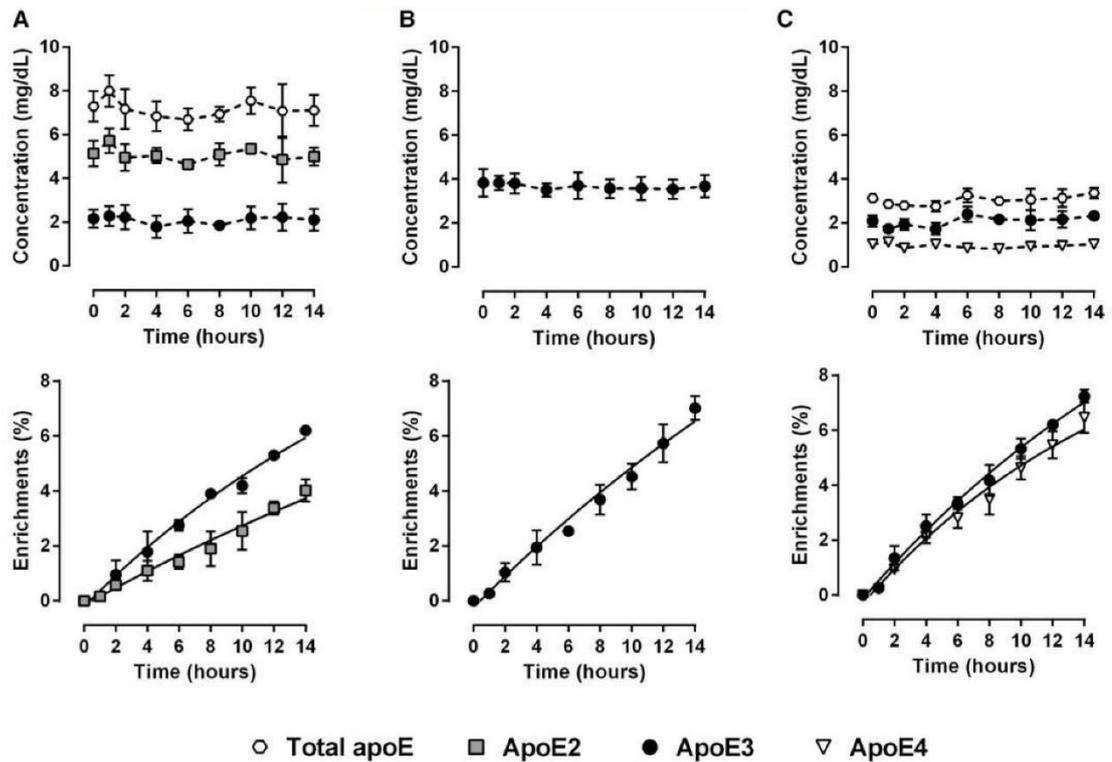


Fig. 3. Kinetics of plasma apoE isoforms. Mean plasma concentrations and mean changes in <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine incorporation over the course of the tracer infusion in subjects with E2/E3 phenotype (A), E3/E3 phenotype (B), and E3/E4 phenotype (C). Values are presented as mean ± standard deviation (n = 3). Total apoE concentrations are shown as indicative in heterozygote patients.

respectively. We did not find any marked difference in total apoE kinetic parameters using both approaches. As shown in Fig. 5, there was a significant correlation between FCRs measured using both approaches ( $r = 0.94, P = 0.001$ ), as well as a significant correlation between PRs ( $r = 0.73, P = 0.031$ ) despite the heterogeneity in the apoE2 PR.

**Distribution of apoE isoforms within lipoproteins**

Compared with the whole plasma concentrations, FPLC and sequential ultracentrifugations gave similar and satisfactory recovery rates for structural apolipoproteins, such as apoA-I for HDL (94% and 84%, respectively) and apoB100 for VLDL, IDL, and LDL (79% and 88%, respectively). A poor recovery was obtained for apoE (48% and 51%, respectively) (supplemental Table S1), likely because apoE sheds off surface lipoprotein particles easily. It is noteworthy that separation of IDLs that were rich in apoE was not optimal (supplemental Fig. S4) and led to a ~130-fold dilution of the original sample by FPLC. In addition, apoE2 and apoE4 peptides displayed ~10-fold lower ionization yields than the common apoE peptide, precluding accurate detection of both isoforms in FPLC fractions despite a concentration procedure. The distribution of apoE isoforms within lipoprotein classes was therefore investigated

in the nondiluted fractions obtained after ultracentrifugation. As shown in Fig. 6A, the major apoE isoform found in apoB100-containing lipoproteins from E2/E3 individuals was apoE3 ( $73.2 \pm 15.6\%$ ), whereas the major apoE isoform in apoA-I-containing lipoproteins was apoE2 ( $66.7 \pm 22.3\%$ ). In contrast, the major apoE isoform present in apoB100-containing lipoproteins from E3/E4 individuals was apoE4 ( $59.3 \pm 8.3\%$ ), whereas the major apoE isoform in apoA-I-containing lipoproteins was apoE3 ( $82.0 \pm 5.6\%$ ) (Fig. 6B), indicating a higher affinity of apoE2 for HDL and of apoE4 for apoB100-containing lipoproteins, while apoE3 distributed homogeneously between lipoprotein classes (Fig. 6C) in those hypertriglyceridemic patients.

**Enrichments of apoE within lipoproteins**

We were not able to detect <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine enrichments of apoE isoforms in lipoprotein fractions because of insufficient sensitivity. Kinetic enrichments of total apoE were therefore investigated within lipoproteins by using the common LGPLVEQGR peptide and we did not observe any pronounced difference on total apoE kinetics between groups (supplemental Fig. S3). In all patients, total apoE FCRs were  $0.49 \pm 0.08$  pool/day and  $2.95 \pm 0.65$  pool/day

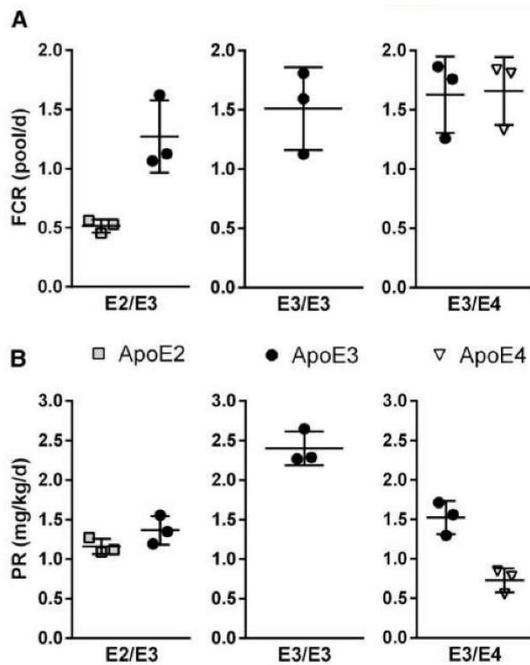


Fig. 4. Kinetic parameters of plasma apoE isoforms. FCRs (A) and PRs (B) estimated with a mono-exponential equation in subjects with E2/E3 phenotype, E3/E3 phenotype, and E3/E4 phenotype.

and PRs were  $0.47 \pm 0.12$  mg/kg/day and  $2.59 \pm 0.91$  mg/kg/day in HDL and VLDL, respectively.

DISCUSSION

We investigated the plasma concentrations, lipoprotein distribution, and kinetic parameters of apoE2, apoE3, and apoE4 in human plasma by LC-MS/MS. Total circulating apoE concentrations and kinetics were different according to apoE isoforms with different repartitions

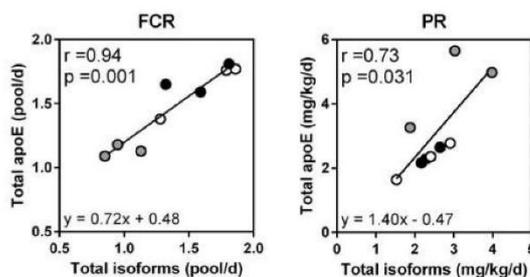


Fig. 5. Validation of plasma apoE kinetic parameters. Total FCRs and PRs were calculated for each subject from kinetic data of apoE isoforms, and then compared (Spearman correlation test) with those obtained directly from the LGPLVEQGR peptide used for total apoE detection. Gray, black, and white circles indicate E2/E3, E3/E3, and E3/E4 phenotypes, respectively.

within lipoproteins. We showed that the differences in the whole plasma apoE isoform concentrations stemmed from a reduced clearance rate of the apoE2 isoform and from a reduced PR of the apoE4 isoform, compared with apoE3.

One limitation of the study was the small number of subjects and the lack of  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ , or  $\epsilon 4/\epsilon 4$  patients. This was related to the very low frequencies of these genotypes in our medical environment. A second limitation of our study was that we used a simple mathematical approach. Because of the small number of subjects per group, we did not develop compartment models including a delay, which might have provided a better fit to the experimental data (9). This compartmental analysis will be mandatory when more subjects are analyzed. But a specific study is required because some patients, especially with E2 isoforms, are few and difficult to recruit. Finally, we did not use calibration solutions with known enrichments for each proteotypic peptide. This was a third limitation and we cannot totally rule out any analytical bias in assessing apoE2 and apoE4 enrichments.

LC-MS/MS is not only reliable to simultaneously quantify several proteins (12, 13, 18) but also to study their polymorphisms (2, 14) and to measure their kinetics (10, 11). This approach involves a trypsin proteolysis before analysis of signature peptides carefully selected to maximize sensitivity, specificity, and stability. Peptide candidate selection is a crucial step that is unfortunately limited when considering polymorphic modifications. Here, we have optimized our previous protocol (10, 12, 14) to quantify and study total apoE and each isoform in human plasma. Despite our efforts to set up optimal proteolysis conditions (2, 19), some of our peptides displayed 10- to 15-fold reduced sensitivities by MS compared with the peptide selected for total apoE measurement, likely because these peptides either contain a methionine or a cysteine residue responsible for side chain reactions and poor stability (2, 10, 20, 21). This reduced sensitivity and stability did not allow the measurement of  $^3H_3$ -leucine enrichments in apoE isoforms in lipoprotein fractions. We were able to get only total apoE kinetics within lipoproteins with the common and more sensitive LGPLVEQGR peptide. Although total apoE kinetic parameters in both HDL and VLDL were in agreement with previous reports (10, 22, 23), we did not observe any marked difference between patients with heterozygous phenotypes. To assess the kinetics of apoE isoforms, the common LGPLVEQGR peptide, therefore, appears to be limited to homozygous phenotypes.

Another hurdle, unrelated to the MS technology, is the exchange of apoE between lipoproteins and their shedding off of the lipoprotein surface by ultracentrifugation, a clear bias for accurate determination of apoE pool sizes (10, 22). In that respect, immuno-affinity separations or softer ultracentrifugation techniques could yield better recovery rates (12, 22, 24). The exchangeability of apolipoproteins could also be a limitation to the determination of apoC's kinetic enrichment curves. However, apoC-II enrichment curves in VLDL and HDL are similar, and those of apoC-III much closer than those observed for apoE. Furthermore, apoE enrichment curves in VLDL and HDL

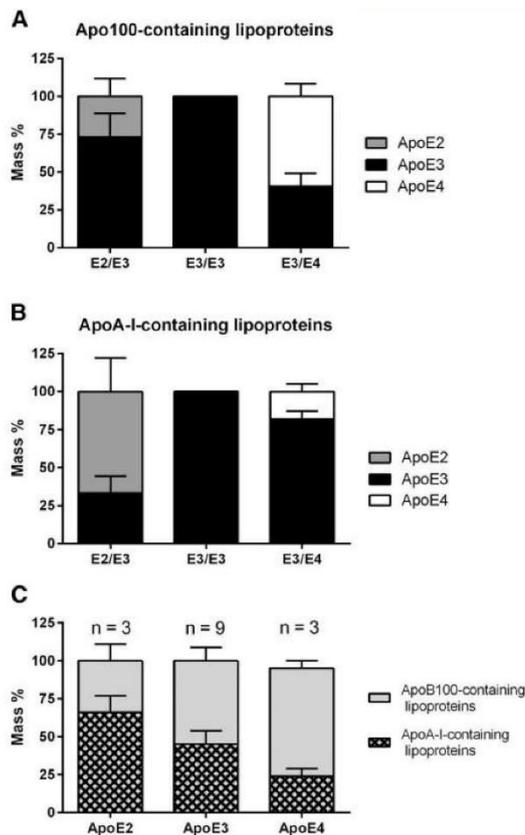


Fig. 6. Distribution of apoE isoforms within lipoproteins in hypertriglyceridemic patients. ApoE isoforms were assayed in apoB100-containing lipoproteins (i.e., VLDL + IDL + LDL) (A) and in apoA-I-containing lipoproteins (i.e., HDL) (B) obtained by ultracentrifugation. C: Summary of apoE isoform distribution within lipoproteins. Concentrations were normalized to the total content of apoE recovered in each lipoprotein subclass. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

parallel those observed for VLDL-apoB100 and HDL-apoA-I (supplemental Figs. S1, S3). While apoC displayed similar kinetics in VLDL and HDL, apoE enrichment curves were sharply different between VLDL and HDL, and relatively close to those of VLDL-apoB100 and HDL-apoA-I, respectively (10, 22), indicating that the differences observed in apoE enrichment between lipoprotein subclasses is genuine and that apoE exchange is limited.

We observed a preferential association of apoE4 with apoB100-containing lipoproteins, in agreement with previous reports (25–27). The presence of a positive charge in the arginine residue at position 112 of apoE4 enhances its affinity for lipids compared with apoE3 (25, 28), and further strengthens its association with VLDL. In addition, the absence of cysteines at positions 112 and 158 reduces apoE4's ability to establish disulfide bonds with HDL-apoA-II (25, 29). In contrast, we observed a preferential association

of apoE2 with HDL, in line with a previous study (30). In contrast with apoE4, the cysteine residue at position 112 in apoE3 and at positions 112 and 158 in apoE2 allows the formation of apoE/apoA-II heterodimers and could explain their preferential association within HDL compared with apoE4 (25, 29, 31, 32). The cysteine residue at position 158 in apoE2 alters its conformation and its ability to bind to the LDLR (28). Whether this might reduce apoE2's ability to associate with apoB100-containing lipoproteins is not established (25, 30).

As anticipated, the catabolic rate of apoE2 was slower than that of apoE3 or apoE4, as previously shown with radio-isotopes (29) or with  $^{13}\text{C}_6$ -leucine in a pilot study conducted in humans (one subject from each genotype, E3/E3, E3/E4, E4/E4 and E2/E4) (33). As mentioned above, the presence of a cysteine instead of an arginine at position 158 reduces the affinity of apoE2 for the LDLR by  $\sim 98\%$  (8, 28), and its affinity for the LRP or HSPG by  $\sim 50\%$ , compared with apoE3 (30), consistent with reduced catabolism. Another mechanism has been proposed (34). Because the turnover of VLDL is much faster than that of HDL, the preferential distribution of apoE2 within HDL could also explain why apoE2 is cleared more slowly than apoE3 or apoE4. In addition, the reduced apoE2 FCR could also be explained by its association with apoA-II in HDL, as detailed above. It has been suggested that both apo(E2/A-II) and apo(A-II/E2/A-II) complexes could prevent LDLR binding by masking the apoE2 component (31, 32).

We also showed that reduced apoE4 concentrations were associated with a 2-fold reduction in apoE4 PR compared with apoE3 and apoE2. This is not due to different gene expression of the three isoforms (35). However, the secretion of apoE2 and apoE4 by macrophages appears to be significantly reduced, compared with that of apoE3 (35), indicating that posttranslational mechanisms governing apoE secretion could be related to its isoforms. Another mechanism could involve the recycling of apoE within the hepatocytes. After the initial secretion, a part of apoE is submitted to a reuptake and is immediately recycled to contribute to the overall production (36). Compared with apoE3, the intracellular hepatocyte recycling of apoE4 derived from VLDL appeared to be lower (37). apoE4 from VLDL is also apparently recycled via distinct cellular pathways (38). The precise cellular mechanisms underpinning the reduced secretion rate of apoE4 clearly remains to be elucidated.

In this study, we have evaluated a novel approach to assess the kinetic parameters of plasma apoE isoforms. We showed that the variations of total apoE plasma concentrations (E2/E3 > E3/E3 > E3/E4) associated with these phenotypes can be explained by reduced catabolic rates for apoE2 and reduced PRs for apoE4. Improvements in the sensitivity of our techniques and in our modeling approach are warranted to assess the kinetics of each apoE isoform within lipoprotein subclasses. **ff**

The authors thank the Therassay core facility for the provision of FPLC AKTA<sup>®</sup> and the staff of the Clinical Investigation Center

of the University Hospital in Nantes, especially Eliane Hivernaud for her invaluable help with patients and blood collection.

## REFERENCES

- Mahley, R. W., and S. C. Rall, Jr. 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1: 507–537.
- Martínez-Morillo, E., H. M. Nielsen, I. Batruch, A. P. Drabovich, I. Begevic, M. F. Lopez, L. Minthon, G. Bu, N. Mattsson, E. Portelius, et al. 2014. Assessment of peptide chemical modifications on the development of an accurate and precise multiplex selected reaction monitoring assay for apolipoprotein E isoforms. *J. Proteome Res.* 13: 1077–1087.
- Dominiczak, M. H., and M. J. Caslake. 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann. Clin. Biochem.* 48: 498–515.
- Mahley, R. W., Y. Huang, and S. C. Rall, Jr. 1999. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries and paradoxes. *J. Lipid Res.* 40: 1933–1949.
- Mahley, R. W. 2016. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J. Mol. Med. (Berl.)* 94: 739–746.
- Moriarty, P. M., S. A. Varvel, P. L. Gordts, J. P. McConnell, and S. Tsimikas. 2017. Lipoprotein (a) mass levels increase significantly according to APOE genotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37: 580–588.
- Martínez-Morillo, E., O. Hansson, Y. Atagi, G. Bu, L. Minthon, E. P. Diamandis, and H. M. Nielsen. 2014. Total apolipoprotein E levels and specific isoform composition in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients and controls. *Acta Neuropathol.* 127: 633–643.
- Rasmussen, K. L. 2016. Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype and risk of dementia and ischemic heart disease: a review. *Atherosclerosis.* 255: 145–155.
- Barrett, P. H., D. C. Chan, and G. F. Watts. 2006. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J. Lipid Res.* 47: 1607–1619.
- Croyal, M., F. Fall, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, Y. Zaïr, K. Ouguerram, M. Krempf, and E. Nobécourt. 2016. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* 57: 509–515.
- Pan, Y., H. Zhou, A. Mahsut, R. J. Rohm, O. Berejnia, O. Price, Y. Chen, J. Castro-Perez, M. E. Lassman, D. McLaren, et al. 2014. Static and turnover kinetic measurement of protein biomarkers involved in triglyceride metabolism including apoB48 and apoA5 by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* 55: 1179–1187.
- Tavori, H., D. Christian, J. Minnier, D. Plubell, M. D. Shapiro, C. Yeang, I. Giunzioni, M. Croyal, P. B. Duell, G. Lambert, et al. 2016. PCSK9 association with lipoprotein (a). *Circ. Res.* 119: 29–35.
- Ceglarek, U., J. Ditttrich, S. Becker, F. Baumann, L. Körtz, and J. Thiery. 2013. Quantification of seven apolipoproteins in human plasma by proteotypic peptides using fast LC-MS/MS. *Proteomics Clin. Appl.* 7: 794–801.
- Croyal, M., K. Ouguerram, M. Passard, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, S. Billon-Crossouard, A. C. de Gouville, G. Lambert, M. Krempf, and E. Nobécourt. 2015. Effects of extended-release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35: 2042–2047.
- Chétiveaux, M., H. Nazih, V. Ferchaud-Roucher, G. Lambert, Y. Zaïr, M. Masson, K. Ouguerram, D. Bouhours, and M. Krempf. 2002. The differential apoA-I enrichment of prebeta1 and alphaHDL is detectable by gel filtration separation. *J. Lipid Res.* 43: 1986–1993.
- Ouguerram, K., M. Chetiveaux, Y. Zaïr, P. Costet, M. Abifadel, M. Varret, C. Boileau, T. Magot, and M. Krempf. 2004. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1448–1453.
- Zhou, H., J. Castro-Perez, M. E. Lassman, T. Thomas, W. Li, T. McLaughlin, X. Dan, P. Jumes, J. A. Wagner, D. E. Gutstein, et al. 2013. Measurement of apo(a) kinetics in human subjects using a microfluidic device with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27: 1294–1302.
- Percy, A. J., A. G. Chambers, J. Yang, D. B. Hardie, and C. H. Borchers. 2014. Advances in multiplexed MRM-based protein biomarker quantitation toward clinical utility. *Biochim. Biophys. Acta.* 1844: 917–926.
- Hoofnagle, A. N. 2010. Quantitative clinical proteomics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: assessing the platform. *Clin. Chem.* 56: 161–164.
- Wildsmith, K. R., B. Han, and R. J. Bateman. 2009. Method for the simultaneous quantitation of apolipoprotein E isoforms using tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 395: 116–118.
- Krastins, B., A. Prakash, D. A. Sarracino, D. Nedelkov, E. E. Niederkofler, U. A. Kiernan, R. Nelson, M. S. Vogelsang, G. Vadali, A. Garces, et al. 2013. Rapid development of sensitive, highthroughput, quantitative and highly selective mass spectrometric targeted immunoassays for clinically important proteins in human plasma and serum. *Clin. Biochem.* 46: 399–410.
- Batal, R., M. Tremblay, P. H. Barrett, H. Jacques, A. Fredenrich, O. Mamer, J. Davignon, and J. S. Cohn. 2000. Plasma kinetics of apoC-III and apoE in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *J. Lipid Res.* 41: 706–718.
- Bach-Ngohou, K., K. Ouguerram, H. Nazih, P. Maugère, B. Ripolles-Piquer, Y. Zaïr, R. Frénais, M. Krempf, and J. M. Bard. 2002. Apolipoprotein E kinetics: influence of insulin resistance and type 2 diabetes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26: 1451–1458.
- Agnani, G., J. M. Bard, L. Candelier, S. Delattre, J. C. Fruchart, and V. Clavey. 1991. Interaction of LpB, LpB:E, LpB:C-III, and LpB:C-III:E lipoproteins with the low density lipoprotein receptor of HeLa cells. *Arterioscler. Thromb.* 11: 1021–1029.
- Weisgraber, K. H. 1990. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J. Lipid Res.* 31: 1503–1511.
- Steinmetz, A., S. Jakobs, S. Motz, and H. Kaffarnik. 1989. Differential distribution of apolipoprotein E isoforms in human plasma lipoproteins. *Arteriosclerosis.* 9: 405–411.
- Gregg, R. E., L. A. Zech, E. J. Schaefer, D. Stark, D. Wilson, and H. B. Jr. Brewer. 1986. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J. Clin. Invest.* 78: 815–821.
- Phillips, M. C. 2014. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life.* 66: 616–623.
- Ikwaki, K., L. A. Zech, H. B. Jr. Brewer, and D. J. Rader. 2002. Comparative in vivo metabolism of apolipoproteins E2 and E4 heterozygous apoE2/E4 subjects. *J. Lab. Clin. Med.* 140: 369–374.
- Mahley, R. W., and Z. S. Ji. 1999. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 40: 1–16.
- Innerarity, T. L., R. W. Mahley, K. H. Weisgraber, and T. P. Bersot. 1978. Apoprotein (E-A-II) complex of human plasma lipoproteins. II. Receptor binding activity of a high density lipoprotein subfraction modulated by the apo(E-A-II) complex. *J. Biol. Chem.* 253: 6289–6295.
- Tozuka, M., H. Hidaka, M. Miyachi, K. Furihata, T. Katsuyama, and M. Kanai. 1992. Identification and characterization of apolipoprotein(AII-E2-AII) complex in human plasma lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1165: 61–67.
- Wildsmith, K. R., J. M. Basak, B. W. Patterson, Y. Pyatkovskyy, J. Kim, K. E. Yarasheski, J. X. Wang, K. G. Mawuenyega, H. Jiang, M. Parsadanian, et al. 2012. In vivo human apolipoprotein E isoform fractional turnover rates in the CNS. *PLoS One.* 7: e38013.
- Brown, M. S., P. T. Kovanen, and J. L. Goldstein. 1981. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science.* 212: 628–635.
- Cullen, P., A. Cignarella, B. Brennhansen, S. Mohr, G. Assmann, and A. Von Eckardstein. 1998. Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and in cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages. *J. Clin. Invest.* 101: 1670–1677.
- Swift, L. L., M. H. Farkas, A. S. Major, K. Vayi-Nagy, M. F. Linton, and S. A. Fazio. 2001. Recycling pathway for rescretion of internalized apolipoprotein E in liver cells. *J. Biol. Chem.* 276: 22965–22970.
- Heeren, J., T. Grewal, A. Laatsch, N. Becker, F. Riminger, K. A. Rye, and U. Beisiegel. 2004. Impaired recycling of apolipoprotein E4 is associated with intracellular cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* 279: 55483–55492.
- Kockx, M., W. Jessup, and L. Kritharides. 2008. Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 1060–1067.

**Supporting information****Kinetics of plasma Apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study**

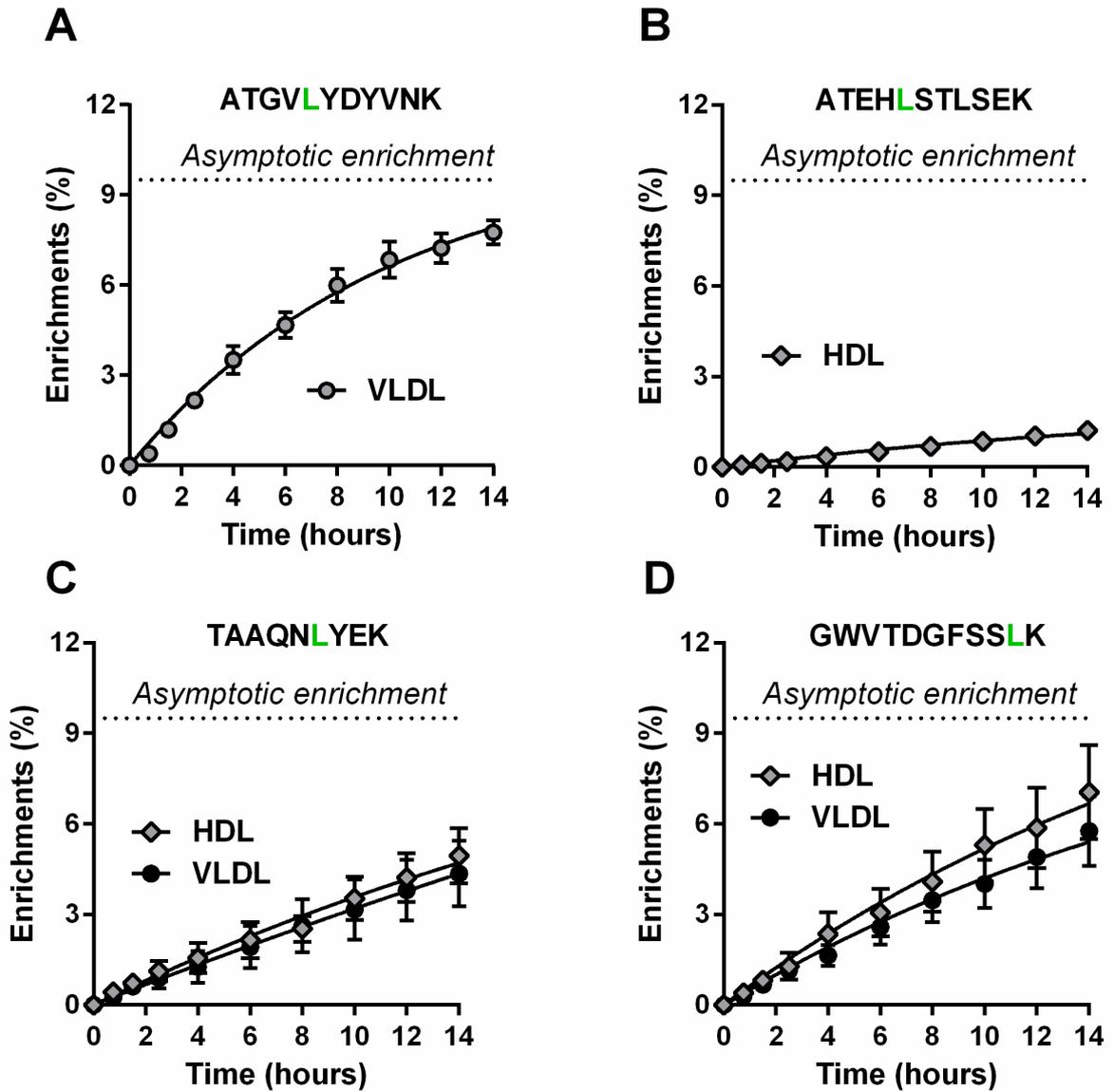
Valentin Blanchard, Stéphane Ramin-Mangata, Stéphanie Billon-Crossouard, Audrey Aguesse, Manon Durand, Kevin Chemello, Brice Nativel, Laurent Flet, Maud Chétiveaux, David Jacobi, Jean-Marie Bard, Khadija Ouguerram, Gilles Lambert, Michel Krempf and  
Mikaël Croyal

**Supplemental Table S1** – Mean recoveries obtained on major apolipoproteins after lipoprotein fractionation by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) or sequential ultracentrifugations (UC). Values are means  $\pm$  SEM (n = 3) and were calculated from total concentrations measured in all lipoprotein fractions and in whole plasma.

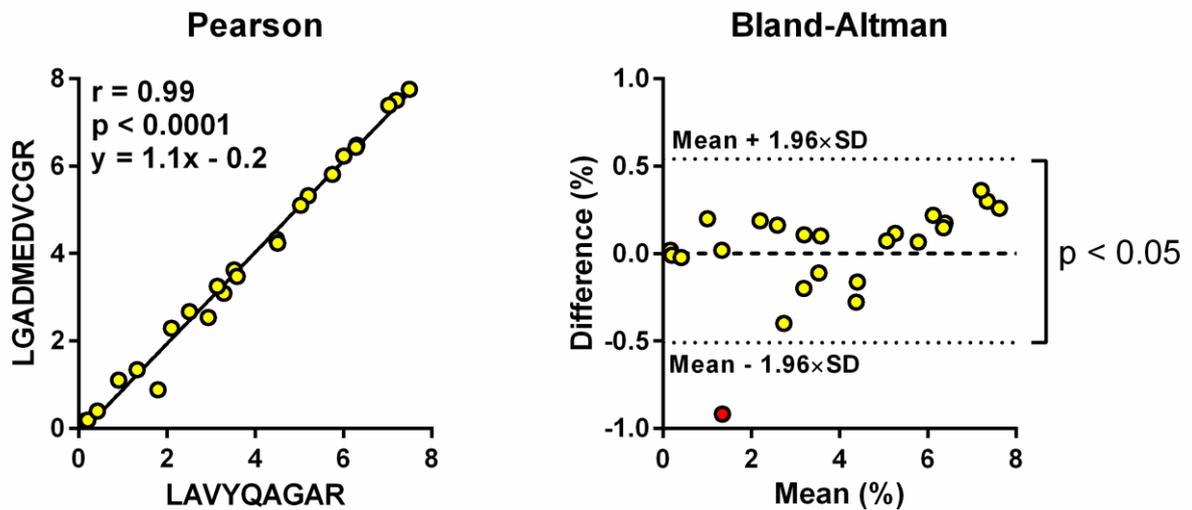
<b>Apolipoproteins</b>	<b>Lipoprotein classes</b>	<b>FPLC (%)</b>	<b>UC (%)</b>
ApoA-I	HDL	94 $\pm$ 4	84 $\pm$ 5
ApoB100	VLDL, IDL, LDL	88 $\pm$ 9	79 $\pm$ 2
ApoE	HDL, VLDL, IDL, LDL	48 $\pm$ 8	51 $\pm$ 5

HDL, high-density lipoprotein; VLDL, very-low-density lipoprotein; IDL, intermediate-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

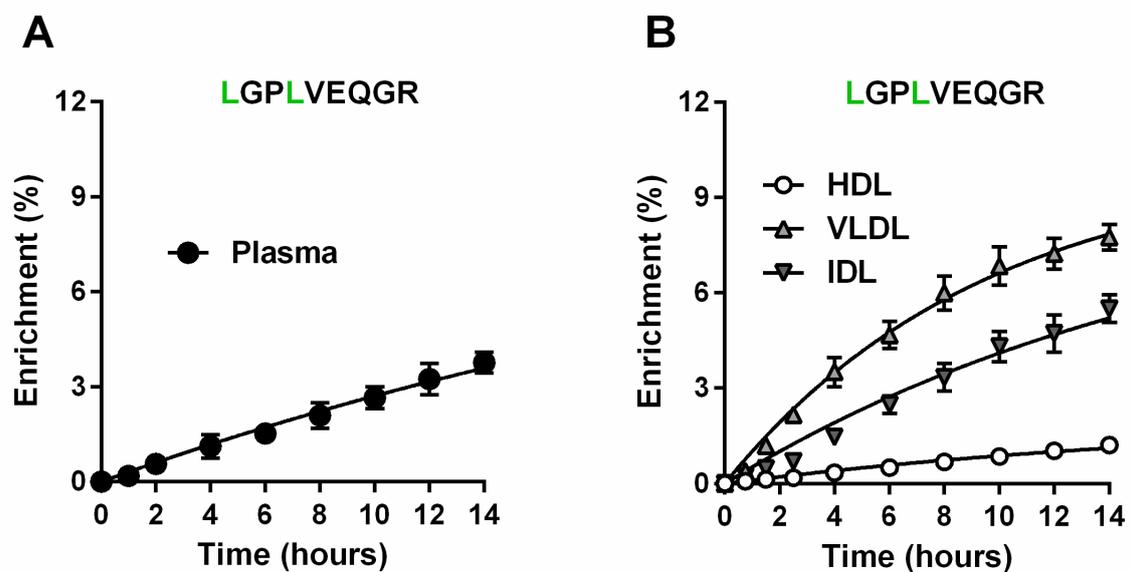
**Supplemental Figure S1** – Mean  $\pm$  standard deviation (n = 9) changes in  $^2\text{H}_3$ -leucine incorporation in VLDL-apoB100 (A), HDL-apoA-I (B), VLDL- and HDL-apoC-II (C) and VLDL- and HDL-apoC-III (D) over the course of the tracer infusion. Asymptotic plateau were used as precursor pool.



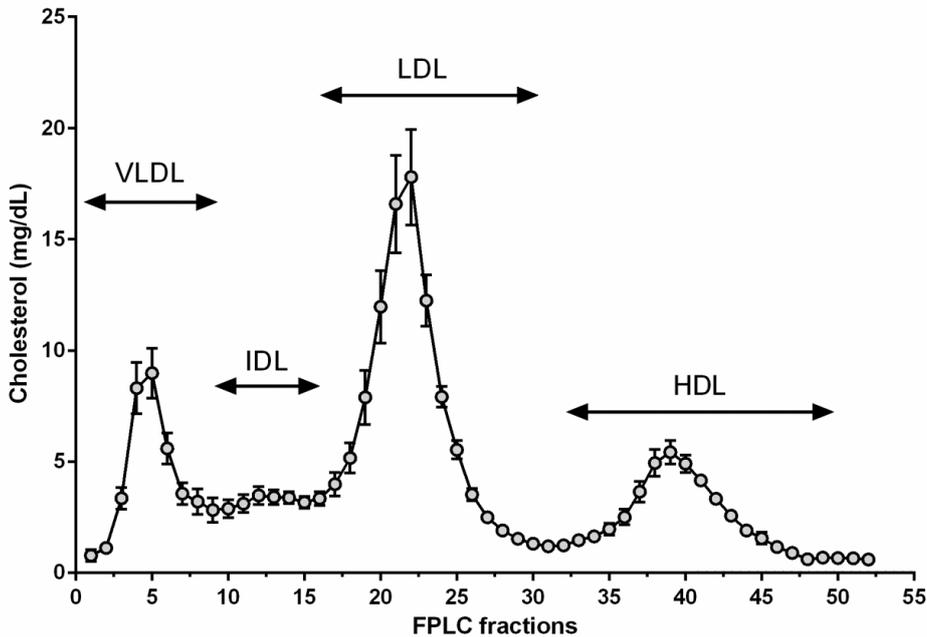
**Supplemental Figure S2** – Comparison of LAVYQAGAR and LGADMEDVCGR peptides for  $^2\text{H}_3$ -Leucine enrichment measurements in plasma apoE3 isoforms from E3/E3 subjects. Pearson correlation obtained between the two peptides and comparison using the Bland-Altman plot (n = 30).



**Supplemental Figure S3** – Mean  $\pm$  standard deviation (n = 9) changes in  $^2\text{H}_3$ -leucine incorporation in total apoE over the course of the tracer infusion (A) in plasma and (B) within lipoproteins. The common LGPLVEQGR peptide was used for LC-MS/MS measurements.



**Supplemental Figure S4** – Mean  $\pm$  standard deviation (n = 9) FPLC profiles obtained in plasma samples from the studied subjects (n = 9) and assessed by cholesterol contents.



## **Discussion et perspectives**

Outre la quantification simultanée de plusieurs protéines, la LC-MS/MS permet l'étude de certains polymorphismes et des flux dans des protocoles employant des traceurs enrichis en isotopes stables (van den Broek et al., 2016; Croyal et al., 2016). L'analyse LC-MS/MS des isoformes de l'apoE est néanmoins complexe. Contrairement à l'apoE2 et à l'apoE4, il n'existe pas de peptide signature unique à l'apoE3. En revanche, il existe un peptide commun à l'apoE3 et à l'apoE2 (LGADMEDVCGR), et un autre commun à l'apoE3 et à l'apoE4 (LAVYQAGAR). L'étude cinétique de l'apoE3 pour les phénotypes E2/E3 et E3/E4 a donc été réalisée à l'aide des peptides LAVYQAGAR et LGADMEDVCGR, respectivement. De plus, les approches cinétiques basées sur l'injection constante d'un traceur nécessitent que le système étudié soit à l'état stationnaire. En d'autres termes, il est nécessaire que la concentration de la protéine étudiée soit constante pendant la durée du protocole afin de faciliter la modélisation. Ce critère a été validé puisqu'aucune variation des concentrations d'apoE totale, ni des trois isoformes, n'a été observée au cours de l'étude.

Nous avons d'abord observé que les concentrations d'apoE totale étaient en moyenne plus élevées chez les patients E2/E3 (7,2 mg/dL) par rapport aux patients E3/E3 (3,8 mg/dL) et aux patients E3/E4 (3,1 mg/dL). Chez les patients E2/E3, les concentrations d'apoE2 (5,1 mg/dL) étaient supérieures à celles d'apoE3 (2,1 mg/dL). A l'inverse, chez les patients E3/E4, les concentrations d'apoE3 (2,1 mg/dL) étaient supérieures à celles d'apoE4 (1,0 mg/dL). Ces résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes (Moriarty et al., 2017; Martínez-Morillo et al., 2014), dont notre validation méthodologique présentée précédemment, et s'expliqueraient par une diminution par 2,5 du taux de catabolisme de l'apoE2 et une diminution par 2 du taux de production de l'apoE4 par rapport à l'apoE3, se traduisant par des niveaux plus élevés d'apoE2 et plus faibles d'apoE4 toujours par rapport à l'apoE3. La diminution de la vitesse de catabolisme de l'apoE2 est probablement liée à son affinité réduite pour le LDLR, le LRP et l'HSPG (Mahley and Ji, 1999). En revanche, la raison pour laquelle la vitesse de production de l'apoE4 est diminuée par rapport à l'apoE3 et l'apoE2 est inconnue. Nous avons également confirmé que l'apoE2 était distribuée préférentiellement dans les HDL (~65%), contrairement à l'apoE3 et l'apoE4 dont la présence est majoritaire dans les lipoprotéines à apoB100 (~55% et ~75% respectivement). La présence des charges positives des arginines en position 130 et/ou 176 sur l'apoE3 et l'apoE4 augmenterait leur affinité pour les lipoprotéines riches en lipides alors que la présence des deux cystéines sur l'apoE2

favoriserait la formation de complexes apoE2/apoA-II sur les HDL, empêchant ainsi l'interaction de l'apoE2 avec le LDLR ([Innerarity et al., 1978](#)).

En parallèle, nous avons cherché à regarder la relation éventuelle entre les cinétiques des isoformes d'apoE et les cinétiques d'apo(a). Malheureusement, ce point n'a pas pu être exploré plus en amont car les neuf patients présentaient des taux d'apo(a) très bas voire indétectables.

Une limite majeure de cette étude est le petit nombre de patients étudiés et le manque de sujets porteurs des phénotypes E2/E2, E2/E4 et E4/E4. Bien que l'inclusion de patients hétérozygotes soit particulièrement intéressante pour évaluer chez un même individu les différences entre deux isoformes, l'inclusion de patients homozygotes permettrait d'explorer plus en détails les particularités cinétiques de chaque isoforme, notamment en utilisant notre peptide générique bien plus sensible et bien plus stable. A noter également que le faible nombre de patients inclus n'a pas permis de réaliser une modélisation optimale des courbes cinétiques. Enfin, le manque de sensibilité du spectromètre de masse ne nous a pas permis d'investiguer les enrichissements des isoformes d'apoE dans les lipoprotéines isolées par ultracentrifugation, c'est pourquoi l'étude cinétique des isoformes n'a pu être réalisée que dans le plasma total.

Cette étude pilote témoigne néanmoins de la puissance analytique de la LC-MS/MS et nous a permis d'approfondir les mesures de flux métaboliques, notamment pour investiguer l'influence de l'apoE sur les niveaux de Lp(a).



## Article 3

# VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein)-ApoE (Apolipoprotein E) May Influence Lp(a) (Lipoprotein [a]) Synthesis or Assembly

Croyal M\*, Blanchard V\*, Ouguerram K, Chétiveaux M, Cabioch L, Moyon T, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Bernardeau K, Le May C, Flet L, Lambert G, Hadjadj S, Cariou B, Krempf M and Nobécourt-Dupuy E.

\*equal contributions

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Mar;40(3):819-829.

### Résumé

*APOE* et *PCSK9* sont les seuls autres gènes significativement impliqués dans la régulation des niveaux plasmatiques de Lp(a) après le gène *LPA* (Erhart et al., 2018; Mack et al., 2017). Comme l'apoE est un ligand majeur du LDLR, l'effet de l'apoE sur les taux de Lp(a) pourrait être dépendant de la voie du LDLR (Romagnuolo et al., 2017; Raal et al., 2016) et donc de son inhibiteur naturel, PCSK9 (Tavori et al., 2016a; Romagnuolo et al., 2015). Cependant, cette hypothèse est controversée puisque plusieurs études indiquent que le LDLR n'est pas impliqué dans la clairance de la Lp(a) et que PCSK9 pourrait réguler la Lp(a) indépendamment du LDLR, notamment en favorisant sa production (Sharma et al., 2017; Villard et al., 2016). Lors de nos précédents travaux nous avons montré *in vivo* chez des singes et des souris humanisées que le LDLR n'était pas impliqué dans la diminution de la Lp(a) médiée par les inhibiteurs de PCSK9 (Chemello et al., 2020; Croyal et al., 2018).

Nous avons donc cherché ici à mieux comprendre les mécanismes régissant les concentrations de Lp(a) en comparant les cinétiques d'apoE et d'apo(a) dans les fractions lipoprotéiques d'individus porteurs de mutations LOF (n = 3) et GOF (n = 4) de *PCSK9* et de mutations du *LDLR* (n = 5). Nous avons également comparé nos résultats avec ceux obtenus dans une précédente étude explorant l'effet de la niacine sur les cinétiques de l'apo(a) (Croyal et al., 2015). Dans cette étude, la diminution des concentrations de Lp(a) (-20%) était expliquée par

une forte baisse de sa production (-50%) partiellement compensée par une baisse de son catabolisme (-37%). Cette étude avait également révélé une forte diminution des concentrations de PCSK9 (-35%) mais sans corrélation significative avec les cinétiques de la Lp(a).

Dans cette nouvelle étude, aucune différence n'a été observée sur les taux cataboliques de la Lp(a), quelle que soit la fonctionnalité du LDLR des patients. Nos résultats ont révélé que la concentration et les taux de production de l'apoE des VLDL sont associés positivement à la concentration et à la vitesse de production de la Lp(a). Ces résultats ont été validés dans l'étude impliquant la niacine où nous avons observé une corrélation positive entre la réduction de la production de l'apoE des VLDL et celle de l'apo(a) après traitement. Ces résultats suggèrent donc que la sécrétion d'apo(a) ou de Lp(a) dans le sang pourrait être en partie gouvernée par l'apoE des VLDL.

## Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

## CLINICAL AND POPULATION STUDIES



## VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein)-Apo E (Apolipoprotein E) May Influence Lp(a) (Lipoprotein [a]) Synthesis or Assembly

Mikaël Croyal,\* Valentin Blanchard,\* Khadija Ouguerram, Maud Châteaux, Lina Cabioch, Thomas Moyon, Stéphanie Billon-Crossouard, Audrey Aguesse, Karine Bernardeau, Cédric Le May, Laurent Flet, Gilles Lambert, Samy Hadjadj, Bertrand Cariou, Michel Krempf, Estelle Nobécourt-Dupuy

**OBJECTIVE:** To clarify the association between PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) and Lp(a) (lipoprotein [a]), we studied Lp(a) kinetics in patients with loss-of-function and gain-of-function *PCSK9* mutations and in patients in whom extended-release niacin reduced Lp(a) and PCSK9 concentrations.

**APPROACH AND RESULTS:** Six healthy controls, 9 heterozygous patients with familial hypercholesterolemia (5 with low-density lipoprotein receptor [*LDLR*] mutations and 4 with *PCSK9* gain-of-function mutations) and 3 patients with heterozygous dominant-negative *PCSK9* loss-of-function mutations were included in the preliminary study. Eight patients were enrolled in a second study assessing the effects of 2 g/day extended-release niacin. Apolipoprotein kinetics in VLDL (very-low-density lipoprotein), LDL (low-density lipoprotein), and Lp(a) were studied using stable isotope techniques. Plasma Lp(a) concentrations were increased in *PCSK9* gain-of-function and familial hypercholesterolemia-*LDLR* groups compared with controls and *PCSK9* loss-of-function groups ( $14 \pm 12$  versus  $5 \pm 4$  mg/dL;  $P=0.04$ ), but no change was observed in Lp(a) fractional catabolic rate. Subjects with *PCSK9* loss-of-function mutations displayed reduced apoE (apolipoprotein E) concentrations associated with a VLDL-apoE absolute production rate reduction. Lp(a) and VLDL-apoE absolute production rates were correlated ( $r=0.50$ ;  $P<0.05$ ). ApoE-to-apolipoprotein (a) molar ratios in Lp(a) increased with plasma Lp(a) ( $r=0.96$ ;  $P<0.001$ ) but not with PCSK9 levels. Extended-release niacin-induced reductions in Lp(a) and VLDL-apoE absolute production rate were correlated ( $r=0.83$ ;  $P=0.015$ ). In contrast, PCSK9 reduction ( $-35\%$ ;  $P=0.008$ ) was only correlated with that of VLDL-apoE absolute production rate ( $r=0.79$ ;  $P=0.028$ ).

**CONCLUSIONS:** VLDL-apoE production could determine Lp(a) production and/or assembly. As PCSK9 inhibitors reduce plasma apoE and Lp(a) concentrations, apoE could be the link between PCSK9 and Lp(a).

**VISUAL OVERVIEW:** An online visual overview is available for this article.

**Key Words:** apolipoprotein E ■ isotopes ■ kinetics ■ lipoprotein (a) ■ loss of function mutation ■ niacin

Lp(a) (lipoprotein [a]) consists of one molecule of apo(a) (apolipoprotein [a]) bound covalently to the apoB100 (apolipoprotein B100) of a LDL (low-density lipoprotein)-like particle. An elevated plasma Lp(a) concentration is regarded as a strong cardiovascular risk factor.<sup>1,2</sup> However, metabolic pathways governing Lp(a) concentrations remain poorly understood.

The LDL receptor (LDLR) was first proposed as a potential route for Lp(a) catabolism, as individuals with familial hypercholesterolemia (FH) and *LDLR* mutations display higher plasma Lp(a) concentrations.<sup>3</sup> The inhibition of PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), a circulating endogenous inhibitor of the LDLR, provided data supporting this hypothesis. PCSK9 inhibitors restored LDLR expression at hepatocyte surfaces,

Correspondence to: Mikaël Croyal, PhD, 8 quai Moncousu, F-44000 Nantes, France. Email mikael.croyal@univ-nantes.fr

\*These authors contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.119.313877>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 828.

© 2020 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at [www.ahajournals.org/journal/atvb](http://www.ahajournals.org/journal/atvb)

### Nonstandard Abbreviations and Acronyms

<b>ApoE</b>	apolipoprotein E
<b>APR</b>	absolute production rate
<b>CTL</b>	control
<b>ERN</b>	extended-release nicotinic acid
<b>FCR</b>	fractional catabolic rate
<b>FH</b>	familial hypercholesterolemia
<b>GOF</b>	gain-of-function
<b>HDL</b>	high-density lipoprotein
<b>IDL</b>	intermediate-density lipoprotein
<b>LDL</b>	low-density lipoprotein
<b>LDL-C</b>	LDL-cholesterol
<b>LOF</b>	loss-of-function
<b>LRP-1</b>	LDLR-related protein
<b>PCSK9</b>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
<b>VLDL</b>	very-low-density lipoprotein

thereby markedly reducing LDL-cholesterol (LDL-C) concentrations.<sup>4,5</sup> In parallel, PCSK9 inhibitors generated an unexpected 20% to 30% reduction in plasma Lp(a) concentrations, proportional to the treatment dose and the baseline level of plasma Lp(a).<sup>6</sup>

PCSK9 inhibition with monoclonal antibodies (ie, alirocumab and evolocumab) or small interfering RNA (ie, inclisiran) similarly reduces Lp(a) plasma levels, albeit through different mechanisms of action.<sup>7,8</sup> However, unlike LDL-C reduction, widely varying responses were observed among individuals in whom Lp(a) was reduced, with no clear relationship with the apo(a) polymorphic size, or the baseline PCSK9 plasma concentration.<sup>9–11</sup> Statins also increase LDLR expression but, in contrast to PCSK9 inhibitors, they have no effect on or only slightly increase the plasma Lp(a) concentration.<sup>12</sup>

Controversial in-vitro results have been also reported regarding the mechanism of action of Lp(a) reduction with PCSK9 inhibitors, ranging from a key role of the LDLR in Lp(a) catabolism<sup>13</sup> to a key role of PCSK9 in Lp(a) production.<sup>14</sup> In humans, Lp(a) fractional catabolic rates (FCR) were found to be similar in patients with FH and controls.<sup>15</sup> In nonhuman primates, we reported that alirocumab strongly reduced the circulating Lp(a) concentration by acting on apo(a) production rate.<sup>16</sup> In humans, in vivo lipoprotein kinetics studies with PCSK9 monoclonal antibodies have also led to conflicting data. While alirocumab induced a nonsignificant increase in the Lp(a) FCR in one study,<sup>17</sup> evolocumab led to a significant decrease in the Lp(a) production rate in another one.<sup>18</sup> However, since the combination of evolocumab with atorvastatin increased Lp(a) FCR, the role of an overexpressed LDLR at the hepatocyte surface in Lp(a) catabolism could be probable.

### Highlights

- PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) inhibitors reduce Lp(a) (lipoprotein [a]) concentrations by 20% to 30% via incompletely understood mechanisms.
- Despite strong variability in plasma PCSK9 and low-density lipoprotein cholesterol concentrations, Lp(a) fractional catabolic rates were similar between patients displaying loss- or a gain-of-function *PCSK9* mutations.
- VLDL (very-low-density lipoprotein)-apoE (apolipoprotein E) absolute production rates were positively correlated with Lp(a)-apo(a) absolute production rate.
- Proteomic analysis of isolated Lp(a) particles showed that the apoE content of Lp(a) increased significantly with plasma Lp(a) but not with PCSK9 concentration.
- Under extended-release niacin-induced reductions of Lp(a), PCSK9, and VLDL-apoE concentrations, the relative changes in the VLDL-apoE and Lp(a)-apo(a) absolute production rates were strongly correlated, whereas changes in plasma PCSK9 concentration correlated only with changes in VLDL-apoE absolute production rate.

The apo(a) size, defined as the number of Kringle IV-2 copies on the *LPA* gene, governs 30% to 70% of circulating Lp(a) levels.<sup>19</sup> Recent studies showed that the *APOE* and *PCSK9* genes may also influence Lp(a) levels.<sup>20,21</sup> We showed that single-nucleotide polymorphisms of apoE (apolipoprotein E), a ligand for the LDLR and the LRP-1 (LDLR-related protein), influence plasma Lp(a) concentrations in patients with FH with *LDLR* mutations.<sup>22</sup> However, the underlying mechanisms remain unknown.

To gain further insight into mechanisms governing Lp(a) concentrations, we studied patients carrying rare loss-of-function (LOF) and gain-of-function (GOF) mutations of *PCSK9*.<sup>23,24</sup> We previously showed that *PCSK9* mutations strongly modulate LDL catabolic rates, independently of any pharmacological inhibitor.<sup>24,25</sup> In the present study, we aimed to extend this research by analyzing Lp(a) kinetics in these patients and their relationships with plasma PCSK9 and other lipoprotein components. We also compared our results with those obtained in an interventional study examining the ability of extended-release niacin (ERN) to reduce LDL-C, PCSK9, and Lp(a) concentrations.<sup>26</sup>

## MATERIALS AND METHODS

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

### Patients and Controls

Lp(a) kinetics were explored in patients with various phenotypes: 3 subjects with the dominant-negative heterozygous

R104C/V114A PCSK9 LOF mutation (PCSK9-LOF group);<sup>24</sup> and 9 patients with FH, consisting of 4 heterozygous PCSK9 GOF mutation carriers (3 with S127R, 1 with R218S; PCSK9-GOF group),<sup>25</sup> and 5 controls with FH and heterozygous LDLR mutations (FH-LDLR group).<sup>27</sup> The control (CTL) group was composed of 6 healthy volunteers.<sup>28</sup> The clinical characteristics of the patients are detailed in Table 1. The Ethics Committee of Nantes approved the clinical protocol, and written informed consent was obtained from all subjects (protocol referenced as no. 15/06-BRD 06/3-E).

### ERN Intervention

We supported our study findings by performing additional analyses of data from a previously reported intervention trial.<sup>26</sup> Eight nondiabetic overweight male subjects (Table 1) were enrolled in a randomized crossover controlled study (8 weeks/phase and a 4-week washout interval) comparing the effects of placebo and 2 g/day ERN. In that study, ERN resulted in the reduction of plasma Lp(a) and PCSK9 concentrations.<sup>26</sup> The Ethics Committee of Nantes approved the clinical protocol (trial no. NCT01216956), and written informed consent was obtained from all subjects.

### Kinetic Protocol

After an overnight fast, each subject received a bolus of 10 μmole/kg 2H<sub>3</sub>-leucine (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA), followed immediately by constant infusion (10 μmole/kg per h) for 14 hours. Blood samples were collected at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 hours, and plasma was separated by centrifugation at 4°C for 30 minutes. Sodium azide, an inhibitor of bacterial growth, and Pefabloc SC (Interchim, Montluçon, France), a protease inhibitor, were added to the blood samples at final concentrations of 1.5 and 0.5 mmol/L, respectively. Plasma lipoprotein fractions, including VLDL (very-low-density lipoprotein), IDL (intermediate-density lipoprotein), LDL, and HDL (high-density lipoprotein) were separated by sequential ultracentrifugation.<sup>25</sup> Samples were stored at -80°C until use.

### Biochemical Measurements

Cholesterol and triglyceride (TG) concentrations were measured using enzymatic kits from Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany). Plasma PCSK9 and Lp(a) concentrations were measured by ELISA (R&D Systems, Lille, France and Aviva Systems Biology Corporation, CA).

**Table 1. Characteristics of Patients**

Patient	Sex	Age, y	BMI, kg/m <sup>2</sup>	PCSK9 Mutation	LDLR Mutation	ApoE Genotype
PCSK9-LOF 1	F	22	22	R104C/V114A	None	E3/E3
PCSK9-LOF 2	M	49	29	R104C/V114A	None	E3/E3
PCSK9-LOF 3	F	29	23	R104C/V114A	None	E3/E3
PCSK9-GOF 1	F	43	22	S127R	None	E3/E3
PCSK9-GOF 2	M	23	19	S127R	None	E3/E3
PCSK9-GOF 3	F	39	33	S127R	None	E3/E3
PCSK9-GOF 4	M	32	27	R218S	None	E3/E3
FH-LDLR 1	F	64	19	None	F105S, exon 4	E3/E3
FH-LDLR 2	M	41	23	None	Frameshift, exon 4	E3/E3
FH-LDLR 3	M	28	28	None	Frameshift, exon 9	E3/E4
FH-LDLR 4	F	50	31	None	W66G, exon 3	E3/E3
FH-LDLR 5	M	57	25	None	A370T, exon 8	E3/E3
CTL 1	M	31	24	None	None	E3/E3
CTL 2	M	21	18	None	None	E3/E3
CTL 3	M	31	24	None	None	E3/E3
CTL 4	M	31	20	None	None	E3/E3
CTL 5	M	26	20	None	None	E3/E3
CTL 6	M	18	20	None	None	E3/E3
OW 1	M	34	32	None	None	E3/E4
OW 2	M	52	34	None	None	E2/E3
OW 3	M	26	32	None	None	E3/E3
OW 4	M	63	29	None	None	E3/E3
OW 5	M	48	30	None	None	E3/E3
OW 6	M	37	32	None	None	E3/E3
OW 7	M	59	29	None	None	E3/E3
OW 8	M	62	31	None	None	E2/E3

ApoE indicates apolipoprotein E; BMI, body mass index; C, cysteine; CTL, control; F, female; FH-LDLR, familial hypercholesterolemia with mutation of LDLR; GOF, gain of function; LDLR, low-density lipoprotein receptor; LOF, loss of function; M, male; OW, overweight (ERN study); PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; R, arginine; and V, valine.

### Plasma Leucine Measurements

Plasma leucine (endogenous leucine and exogenous  $2\text{H}_3$ -leucine) concentrations were measured by electron-impact gas chromatography–mass spectrometry as described previously.<sup>25</sup> Briefly, amino acids were purified by cation exchange chromatography and then derivatized by heptafluorobutyric acid. The isotopic ratio was determined by selected ion monitoring at mass-to-charge ratios of 282 (leucine) and 285 ( $^2\text{H}_3$ -leucine).

### Lp(a) Immunoprecipitation

Lp(a) was immunoprecipitated from plasma samples (50  $\mu\text{L}$ ) using the precoated wells of an Lp(a) ELISA kit (Aviva Systems Biology Corporation, monoclonal antibody). After the performance of blocking procedures according to the supplier's instructions, the wells were washed and trypsin digested for mass-spectrometry analyses.

### Apolipoprotein Quantification

Apolipoproteins were quantified in plasma and lipoprotein fractions using trypsin proteolysis and subsequent analysis of proteotypic peptides by liquid chromatography–tandem mass spectrometry as described previously.<sup>26,29,30</sup> Quantification was performed with 3 replicates at all kinetic time points. Apo(a) polymorphic sizes were determined using 2 proteolytic peptides,<sup>26</sup> and apoE phenotypes were determined using a combination of 5 proteolytic peptides.<sup>30</sup> The intra- and inter-assay variabilities did not exceed 7.1%.

### Apolipoprotein Enrichment Measurement

The isolation and measurement of leucine enrichment in apoB100 were performed as described previously.<sup>25</sup> Briefly, apoB100-containing lipoprotein fractions (VLDL, IDL, LDL) were isolated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and then hydrolyzed with concentrated hydrochloric acid solution. Amino acids were purified by cation exchange chromatography, derivatized (with heptafluorobutyric acid), and analyzed by gas chromatography–mass spectrometry as described above. VLDL-apoE and Lp(a)-apo(a) leucine enrichments were measured in concentrated lipoprotein fractions by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, as detailed previously.<sup>26,29</sup> As the majority ( $\approx 95\%$ ) of Lp(a) particles are located in the density range of 1.019 to 1.210 g/mL following ultracentrifugation of plasma samples, equal volumes of ultracentrifuged fractions of LDL (1.019–1.063 g/mL), and HDL (1.063–1.21 g/mL) were combined. Leucine enrichment measurements were performed on 3 replicates at all kinetic time points, and the intra- and inter-assay variabilities did not exceed 6.8%.

### Modeling

Lp(a)-apo(a) and VLDL-apoE FCRs were estimated using the SAAM II modeling program (Epsilon Group, Charlottesville, VA) and by fitting of a mono-compartmental model.<sup>26,29</sup> Kinetic data for VLDL- and LDL-apoB100 were calculated using a multiple compartmental model including IDL-apoB100 enrichment measurements, as described previously.<sup>25</sup> Due to the heterogeneity of patients' lipid profiles, the asymptotic plasma leucine plateau (tracer-to-tracee ratio) was used as a pool precursor,

instead of the VLDL-apoB100 asymptotic plateau. Pool sizes were considered to be constant, as no significant variation was observed in apolipoprotein concentrations at different sampling times (concentration variations within 8.2%). At this steady state, the FCR was equal to the fractional synthetic rate. Therefore, absolute production rates (APRs) were calculated as the products of the FCR and the pool sizes of apolipoproteins in lipoprotein fractions, and assuming a plasma volume of 4.5% of body weight.

### Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SDs, unless otherwise specified. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 6.0; GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). Due to the small number of patients, only *P* for trend values (obtained by the Kruskal-Wallis test) are presented for group comparison. Pairwise statistical analyses were conducted with Spearman correlation tests, and the nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to evaluate ERN effects. Results were considered to be significant at  $P < 0.05$ . Data were finally explored with a principal component analysis and a principal component analysis regression circle (SIMCA-P+, version 13.0; Umetrics, Umea, Sweden). A correlation network was also established between all biochemical data with only positive correlations and *r* coefficients  $> 0.5$ . The correlation network was calculated and visualized using the Cytoscape software (<http://www.cytoscape.org/>).

## RESULTS

### Biochemical Findings

Baseline lipid parameters of the patients are provided in Table 2. As expected, patients in the *PCSK9*-LOF group displayed dramatically reduced plasma total cholesterol, LDL-C, and *PCSK9* concentrations compared with the other groups. Plasma concentrations of apoB100 and apoE were also reduced in these patients. In contrast, LDL-C and plasma apoB100 concentrations were increased in the *PCSK9*-GOF and *FH-LDLR* groups, associated with a trend of higher plasma apoE concentrations. Plasma Lp(a) and apo(a) concentrations were significantly correlated ( $r = 0.60$ ;  $P = 0.009$ ). Plasma Lp(a) concentrations were increased in patients with *PCSK9*-GOF and *LDLR* mutations ( $14.0 \pm 12.1$  mg/dL,  $n = 9$ ) compared with the others ( $5.3 \pm 3.6$  mg/dL,  $n = 9$ ;  $P = 0.039$ ). Analysis of lipoprotein apolipoprotein content showed reduced concentrations of apoB100 and apoE in the VLDL and LDL fractions in the *PCSK9*-LOF group (Tables I and II in the online-only Data Supplement). After specific immunoprecipitation of Lp(a) particles, apo(a) concentrations were close to the sum of recovery in the VLDL, LDL, and HDL fractions. In isolated Lp(a) particles, the apoB100-to-apo(a) molar ratio was close to 1, excluding possible contaminations with other apoB-containing lipoproteins, whereas the apoE-to-apo(a) molar ratio ranged from 0.5 to 3 and correlated with plasma Lp(a) concentrations ( $r = 0.96$ ,  $P < 0.0001$ ;

**Table 2. Biochemical Parameters of Patients**

Parameter	PCSK9-LOF (n=3)	PCSK9-GOF (n=4)	FH-LDLR (n=5)	CTL (n=6)	P Value for Trend
TC, mg/dL	114 (100–143)	361 (292–408)	440 (388–461)	165 (125–198)	0.0001
TG, mg/dL	49 (34–71)	213 (75–268)	164 (131–189)	71 (47–114)	0.0012
LDL-C, mg/dL	44 (16–58)	281 (241–326)	327 (237–415)	86 (64–136)	0.0001
HDL-C, mg/dL	75 (63–83)	38 (36–42)	35 (31–50)	52 (41–66)	0.0009
ApoA-I, mg/dL	174 (158–198)	103 (96–110)	102 (94–105)	109 (95–134)	0.0377
ApoB100, mg/dL	21 (20–37)	175 (155–196)	169 (104–208)	80 (45–114)	0.0001
ApoC-II, mg/dL	1.6 (0.8–2.3)	2.0 (0.8–2.2)	2.0 (1.3–2.8)	1.5 (1.3–2.1)	0.5610
ApoC-III, mg/dL	5.8 (2.9–9.4)	8.6 (3.5–12.7)	4.0 (2.6–7.1)	4.2 (3.1–5.4)	0.3288
ApoE, mg/dL	4.2 (3.1–4.5)	9.1 (6.4–11.4)	6.7 (3.6–11.2)	4.4 (3.0–6.6)	0.0147
PCSK9, ng/mL	38 (0–89)	181 (100–398)	288 (142–303)	232 (194–322)	0.0292
Lp(a), mg/dL	3.6 (3.3–6.6)	6.5 (4.8–29.5)	12.2 (3.2–33.4)	4.0 (3.1–14.6)	0.2234
Apo(a), nmol/L	16 (14–23)	32 (15–114)	16 (10–141)	14 (4–54)	0.5939
Kringle IV repeat, n	22 (21–33)	20 (13–30)	22 (15–32)	24 (16–38)	0.4207

Values are presented as median (range). P for trend values were obtained by Kruskal-Wallis tests. Apo indicates apolipoprotein; CTL, control; FH-LDLR, familial hypercholesterolemia with mutation of the low-density lipoprotein receptor; GOF, gain of function; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; Kr-IV, Kringle IV; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; LOF, loss of function; Lp(a), lipoprotein (a); PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; TC, total cholesterol; and TG, triglyceride.

Figure 1) but not with plasma PCSK9 concentrations ( $r=0.30$ ,  $P=0.222$ ). The apoE-to-apoB100 ratio calculated in VLDL and LDL particles was not correlated with plasma Lp(a) levels, suggesting a specific role of apoE in Lp(a) production/assembly irrespective of both VLDL and LDL pools. Of note, Lp(a) plasma concentrations were not correlated with plasma TG ( $r=0.35$ ,  $P=0.157$ ).

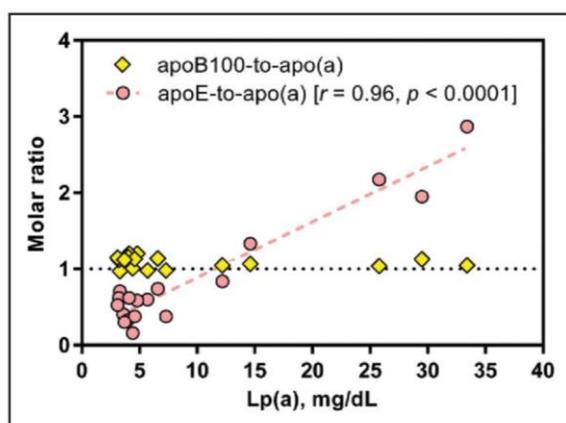
### Kinetics of Lp(a) and Other Apolipoproteins

The asymptotic plasma leucine plateaus used as precursor pools were of  $10.1 \pm 0.2\%$  (PCSK9-LOF),  $11.0 \pm 1.2\%$  (PCSK9-GOF),  $10.4 \pm 0.5\%$  (FH-LDLR), and  $8.6 \pm 0.5\%$  (CTL). The reduced precursor pool of CTL patients could explain the marked difference in VLDL-apoB100 asymptotic plateaus between CTL and PCSK9-LOF patients (Figure 2A). But the opposite was observed for VLDL-apoE. This could stem from the sharply distinct lipid

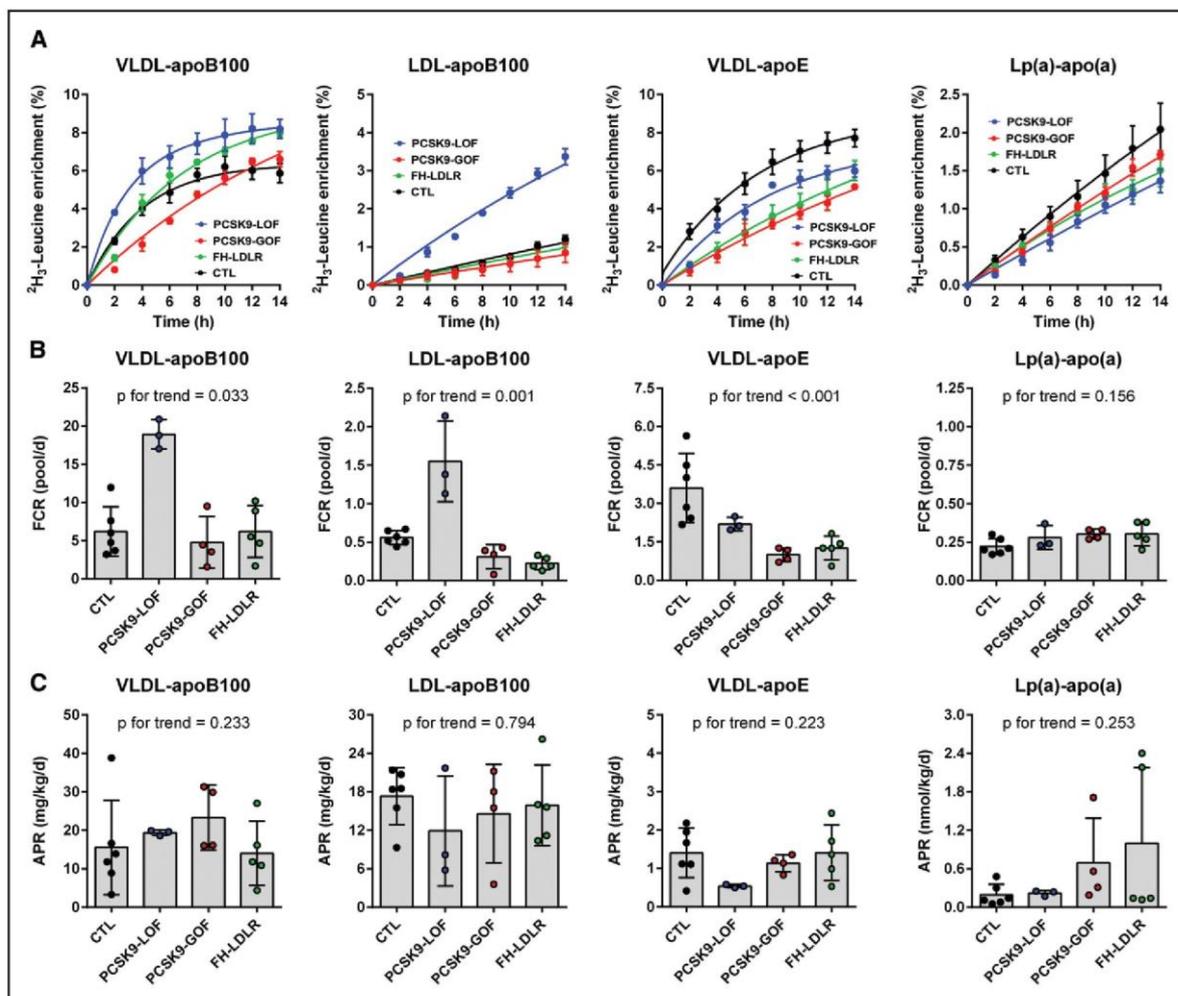
profiles of those patients. Since CTL individuals displayed elevated plasma TG and reduced HDL-C (Table 2) compared with PCSK9-LOF subjects, apoE could for instance be differently exchanged between VLDL and HDL particles in such patients. Lp(a)-apo(a) FCR were similar in all groups (Figure 2). The APR of Lp(a)-apo(a) was within the same lower range in the CTL and PCSK9-LOF groups and was slightly increased in the FH-LDLR and PCSK9-GOF groups. The VLDL-apoE FCR was lower in the FH-LDLR and PCSK9-GOF groups and was slightly decreased in the PCSK9-LOF group compared with the CTL group. The VLDL-apoE APR was within the same range in the CTL, PCSK9-GOF, and FH-LDLR groups and decreased in the PCSK9-LOF group. The VLDL- and LDL-apoB100 FCRs were dramatically increased in the PCSK9-LOF group, and the LDL-apoB100 FCR was decreased in the FH-LDLR and PCSK9-GOF groups. Of note, plasma PCSK9 concentrations correlated negatively with the VLDL-apoB100 ( $r=-0.57$ ;  $P=0.015$ ) and LDL-apoB100 ( $r=-0.47$ ;  $P=0.049$ ) FCRs, but not with their APRs. Unfortunately, we were not able to detect Lp(a)-apoB100 and Lp(a)-apoE enrichments in isolated Lp(a) particles because of liquid chromatography–tandem mass spectrometry limits of detection. Due to this methodological limitation, we were not able to develop a multicompartmental model to evaluate the kinetics of Lp(a) components (apoB100, apo(a) and apoE).

### Parameters Governing Lp(a) Kinetics

Lp(a)-apo(a) concentrations and APR were strongly and negatively correlated with the mean repeats of Kringle IV ( $r=-0.64$ ,  $P=0.004$  and  $r=-0.71$ ,  $P<0.001$ , respectively; Table 3). No significant correlation was found between Lp(a)-apo(a) kinetic parameters and plasma PCSK9 concentrations or VLDL- or LDL-apoB100



**Figure 1. Lp(a) (lipoprotein [a]) composition.** ApoB100-to-apo(a) and apoE (apolipoprotein E)-to-apo(a) molar ratios in Lp(a), isolated by immunoprecipitation (Spearman test).



**Figure 2. Kinetics of targeted apolipoproteins.** **A**, Mean±SEM kinetic curves obtained over the course of tracer infusion, **(B)** fractional catabolic rates (FCRs), and **(C)** absolute production rates (APRs) deduced from kinetic curves. *P* for trend values were obtained by Kruskal-Wallis tests. FH indicates familial hypercholesterolemia; GOF, gain-of-function; LOF, loss-of-function; and PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9.

kinetics. The main finding was the significant correlations observed between Lp(a)-apo(a) and VLDL-apoE kinetics parameters. Total apoE and VLDL apoE concentrations and VLDL-apoE APR correlated positively with Lp(a)-apo(a) concentrations and APR (Table 3) but not with the Lp(a)-apo(a) FCR. The VLDL-apoE FCR correlated with the Lp(a)-apo(a) FCR. No significant correlation was found between the plasma PCSK9 concentration and any concentration or kinetics parameters of apoE. Additional correlations between apoB100, apoE, and apo(a) kinetic parameters are shown in Table III in the online-only Data Supplement. As expected, VLDL-apoE was significantly correlated with plasma TG ( $r=0.59$ ;  $P=0.009$ ) and VLDL-apoB100 ( $r=0.73$ ;  $P=0.001$ ). Only a nonsignificant trend was found for the correlation between VLDL-apoB100 and Lp(a)-apo(a) ( $r=0.45$ ;  $P=0.063$ ).

### Modulation of Lp(a), apoE, and PCSK9 With ERN

To further evaluate the association between Lp(a)-apo(a) and VLDL-apoE APRs, we studied the effects of ERN on the lipoprotein kinetics of patients with mild hypertriglyceridemia. As reported previously and summarized in Table IV in the online-only Data Supplement, ERN improved the lipid profile by reducing Lp(a)-apo(a) by 20% ( $P=0.008$ ), apoB100 by 21% ( $P=0.008$ ), TG by 44% ( $P=0.023$ ), and LDL-C by 16% ( $P=0.039$ ). ERN also increased HDL-C by 22% ( $P=0.008$ ). Plasma PCSK9 and VLDL-apoE concentrations were also reduced with ERN by 35% ( $P=0.008$ ) and 42% ( $P=0.008$ ), respectively, whereas no significant change was observed in total apoE concentrations. We previously showed that the ERN-induced reduction of Lp(a)-apo(a) concentrations was related to

**Table 3. Associations Between Kinetics of Lp(a)-apo(a) and Other Lipid Parameters**

Parameter	Lp(a)-apo(a) Kinetic Parameters		
	Concentration	FCR	APR
Kr-IV repeat	-0.64 (0.004)	ns	-0.71 (<0.001)
PCSK9	ns	ns	ns
ApoE	0.54 (0.020)	ns	0.60 (0.009)
VLDL-apoE	0.57 (0.011)	ns	0.63 (0.005)
VLDL-apoE FCR	Ns	0.57 (0.013)	ns
VLDL-apoE APR	0.48 (0.045)	ns	0.50 (0.035)
ApoB100	Ns	ns	ns
VLDL-apoB100	Ns	ns	ns
VLDL-apoB100 FCR	Ns	ns	ns
VLDL-apoB100 APR	Ns	ns	ns
LDL-apoB100	Ns	ns	ns
LDL-apoB100 FCR	Ns	ns	ns
LDL-apoB100 APR	Ns	ns	ns

Values are presented as *r* (*p*) values (Spearman test). apo(a) indicates apolipoprotein (a); Apo, apolipoprotein; APR, absolute production rate; FCR, fractional catabolic rate; Kr-IV, Kringle IV; LDL, low-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein (a); ns, not significant (*p*>0.05); PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; and VLDL, very-low-density lipoprotein.

a balance between a 50% reduction in the Lp(a)-apo(a) APR and a 37% reduction in the Lp(a)-apo(a) FCR. In contrast, we observed that the decrease in VLDL-apoE concentrations was related to the reduction of its APR by 47% (*P*=0.008; Figure 3A). Additional correlations between changes related to ERN are shown in Table V in the [online-only Data Supplement](#) and Figure 3B. Interestingly, changes in the VLDL-apoE APR correlated with changes in the Lp(a)-apo(a) APR (*r*=0.83; *P*=0.015) and plasma PCSK9 concentration (*r*=0.79; *P*=0.028). A nonsignificant trend for a positive correlation between changes in the Lp(a)-apo(a) APR and plasma PCSK9 concentration (*r*=0.69; *P*=0.070) was also noted (Figure 3B). Of note, in isolated Lp(a) particles, the apoE-to-apo(a) molar ratio was still correlated with plasma Lp(a) concentrations (*r*=0.82; *P*=0.0132, Figure I in the [online-only Data Supplement](#)). Again, no significant correlation was found between Lp(a) concentrations and the apoE-to-apoB100 ratios calculated in VLDL/LDL particles.

### Multivariate Analysis Findings

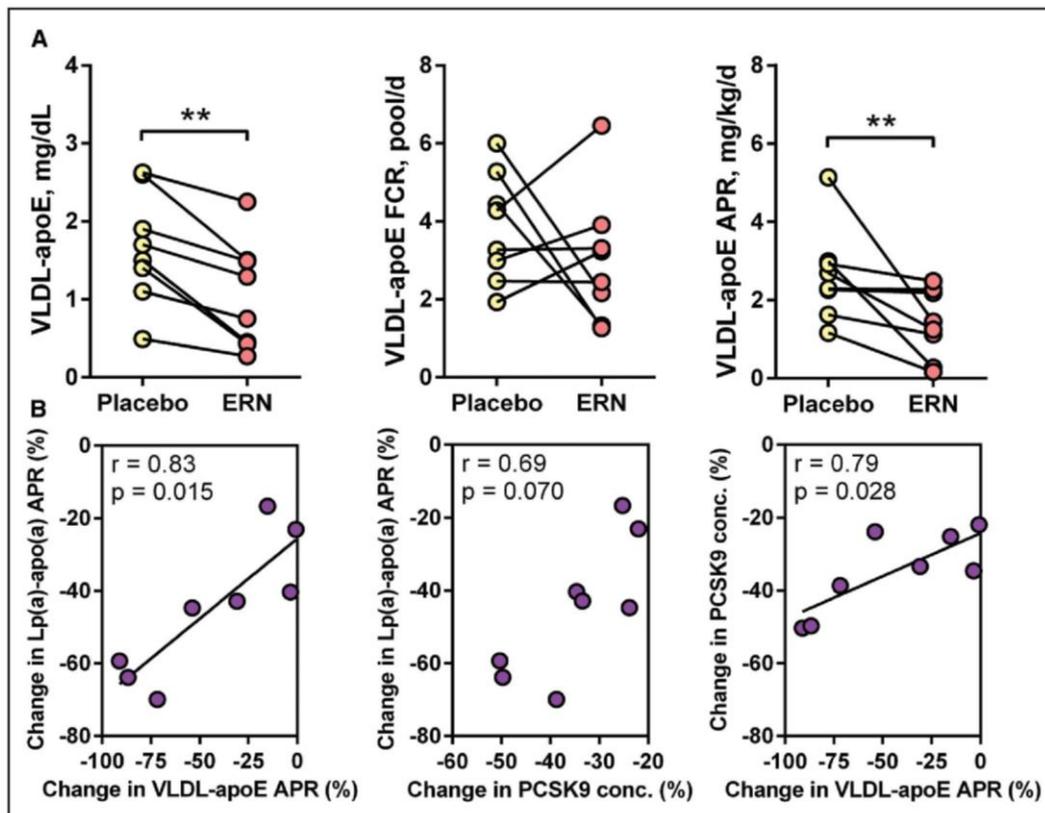
To further assess and confirm the determinants of apo(a)/Lp(a) concentrations, we performed multivariate analyses of the lipid and lipoprotein parameters of all studied patients. Principal component analysis clearly identified all groups (Figure 4A) and explained 55% of the variance in apo(a) concentrations. The correlation cluster identified variables associated positively with apo(a), including age, TG, VLDL-apoB100, plasma apoE, and PCSK9, whereas apo(a) Kringle IV repeats were strongly and negatively correlated. Importantly, the

correlation network clearly associated VLDL-apoE concentrations and APR as main determinants of plasma apo(a) concentrations (Figure 4B).

### DISCUSSION

We showed that plasma Lp(a) concentrations were slightly increased in patients with FH with *LDLR* or *PCSK9*-GOF mutations compared with healthy subjects and those with *PCSK9* LOF mutations, but no significant effect was observed on the Lp(a)-apo(a) production and catabolic rates. We also showed a reduction in plasma apoE concentration in patients with *PCSK9* LOF mutation, related mainly to a decrease in its APR into VLDL. Interestingly, VLDL-apoE APR was positively correlated with Lp(a)-apo(a) APR. In addition, the specific analysis of Lp(a) particles revealed that the apoE-to-apo(a) molar ratio increased significantly with plasma Lp(a), but not PCSK9, concentration. Under ERN-induced reductions of Lp(a), PCSK9 and VLDL-apoE concentrations, the relative changes in the VLDL-apoE and Lp(a)-apo(a) APRs were strongly correlated, whereas changes in plasma PCSK9 concentration correlated only with changes in VLDL-apoE APR.

This finding is somewhat unexpected as patients with type 2 diabetes mellitus often exhibit elevated TG concentrations, attributed to an overproduction and a reduced clearance of triglyceride-rich lipoproteins,<sup>31</sup> and reduced Lp(a) concentrations.<sup>32</sup> In addition, other studies showed a negative association between Lp(a) and TG plasma levels<sup>33</sup> and between plasma Lp(a) and extra-large, large, and medium-sized VLDL particles.<sup>34</sup> Another study reported a delayed catabolism of a portion of Lp(a) in a homozygous apoE-deficient subject, resulting in elevated Lp(a) plasma concentration.<sup>35</sup> However, this work aimed to clarify the relationship between PCSK9 and Lp(a) metabolisms, as PCSK9 inhibitors reduce plasma Lp(a) levels.<sup>36</sup> To achieve this goal, we included patients with rare *PCSK9* LOF and GOF mutations. The patients with *PCSK9* LOF mutations originated from the same family and carried the same mutation (R104C/V114A). Patients with heterozygous *PCSK9* GOF mutations came from 2 families with different mutations (S127R and R218S) but displayed homogenous kinetic parameters. As reported previously, VLDL- and LDL-apoB100 FCRs were strongly increased in the *PCSK9*-LOF group, and LDL-apoB100 FCR was decreased in the *PCSK9*-GOF group, similarly to those in patients with heterozygous FH-*LDLR* mutations.<sup>24,25</sup> Despite strong differences in plasma PCSK9 concentrations or LDL-apoB100 FCR, Lp(a)-apo(a) FCR was similar in patients carrying *PCSK9* LOF and GOF mutations. These results challenge the role for PCSK9 in Lp(a) catabolism, as observed previously with PCSK9 inhibitors in human hepatocytes in vitro<sup>14</sup> and in nonhuman primates or healthy volunteers in vivo.<sup>16,18</sup> However, Lp(a)-apo(a) APR did not correlate



**Figure 3. Modulation of VLDL (very-low-density lipoprotein)-apoE (apolipoprotein E) kinetics by extended-release niacin (ERN) treatment and associations with PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), and apo(a) changes.**

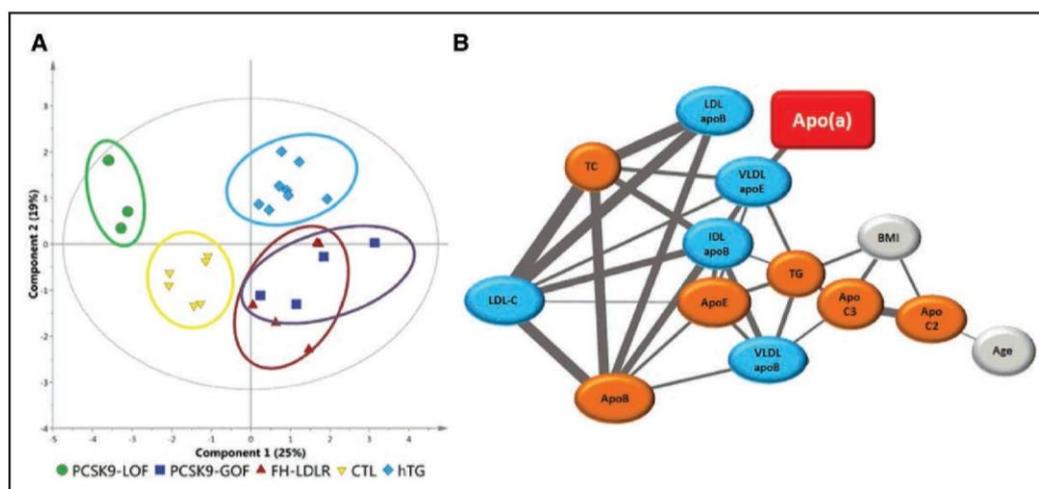
**A**, Effect of ERN on VLDL-apoE kinetics (Wilcoxon test). **B**, Spearman correlations between changes in the VLDL-apoE absolute production rate (APR), Lp(a)-apo(a) APR, and PCSK9 concentration.

with plasma PCSK9 concentrations, likely due to the small number of subjects.

Beyond Lp(a) levels, PCSK9 inhibitors also reduce plasma apoE concentrations.<sup>17,37</sup> In this study, total plasma and VLDL apoE concentrations were lowered in the *PCSK9*-LOF group compared with the *FH-LDLR* and *PCSK9*-GOF groups. Interestingly, the Lp(a)-apo(a) APR was strongly correlated with total plasma and VLDL apoE concentrations and VLDL-apoE APR. As previous studies using PCSK9 inhibitors did not explore apoE kinetics, we gained further insights from additional analyses from an ERN study that previously showed reduction of plasma Lp(a) and PCSK9 concentrations.<sup>26</sup> Here, we showed that ERN strongly reduced the VLDL-apoE concentration as a consequence of a sharp reduction in its APR. The reduction in VLDL-apoE production was correlated with that of Lp(a)-apo(a), whereas the interaction with that of the plasma PCSK9 concentration was more puzzling. Therefore, apoE and especially VLDL-apoE may influence Lp(a) production, synthesis, or assembly, but the role of PCSK9 in this phenomenon remains to be determined. It could be related to similar modulations of production rates of VLDL carrying apoE and apo(a),

as suggested by reduced VLDL-apoE and Lp(a)-apo(a) APRs in patients with *PCSK9* LOF mutations. However, the VLDL-apoB100 APR did not differ in these patients compared with the others.

Lp(a) and apoE interactions have not been explored in depth, probably because Lp(a) synthesis and regulation are not clearly understood.<sup>36</sup> Whether Lp(a) assembly occurs in hepatocytes, at hepatocyte surfaces, or in the Disse space remains a matter of debate, but several kinetic studies suggested that a large part of Lp(a) assembly takes place outside of hepatocytes.<sup>38,39</sup> Lp(a) synthesis requires the covalent binding of Kringle IV-9 of apo(a) [C4057] to apoB100 [C4326] by a disulfide bond.<sup>30</sup> However, the role of the native lipoprotein composition for final Lp(a) synthesis remains unclear. Proteomic analyses identified numerous proteins associated with Lp(a) beyond apo(a) and apoB100, such as apoA-I, apoC-I, apoC-II, apoC-III, and apoE.<sup>40</sup> In addition, correlation networks indicated strong interactions between apo(a), apoB100, and apoE.<sup>40,41</sup> Hence, we can speculate that changes in apoE concentrations in Lp(a) precursors act on apo(a)-apoB100 binding. In support of this hypothesis, epidemiological studies demonstrated



**Figure 4. Results of multivariate analyses of lipid and lipoprotein parameters.**

**A**, Comparison of patients' plasma fingerprints by principal component analysis (PCA). **B**, Correlation network obtained for the biochemical parameters. Only positive associations with  $r > 0.5$  are presented. ApoE indicates apolipoprotein E; GOF, gain-of-function; and PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9.

differences in plasma Lp(a) concentrations between apoE genotypes based on the 3 major isoforms of human apoE ( $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ ).<sup>29,30,34,35</sup> We also reported recently that apoE genotypes modulate plasma Lp(a) and apoE concentrations in patients with FH.<sup>22,30</sup> Here, we showed that total and VLDL apoE concentrations correlated with apo(a) concentrations, irrespective of the apoE genotype, as all patients displayed the E3/E3 phenotype except one (E3/E4). Our observations suggest that apo(a) and therefore Lp(a) are modulated by apoE, with distinct mechanisms involving the apoE genotype and VLDL-apoE concentration.

Interventional studies on plasma Lp(a) levels with different lipid-lowering drugs exhibiting various mechanisms of action (PCSK9 inhibitor,<sup>18</sup> apoB100 antisense oligonucleotide,<sup>45</sup> CETP inhibitor,<sup>46,47</sup> ezetimibe,<sup>48</sup> fibrates,<sup>48,49</sup> and statins<sup>37,49–51</sup>) also suggested that plasma Lp(a) reduction is associated with a decrease in the total or VLDL apoE concentration. A decrease in the Lp(a) production rate is the most frequently offered explanation for Lp(a) reduction, irrespective of treatment. In contrast, the mechanisms by which apoE is reduced are more puzzling and involve catabolic or production rates in HDL or VLDL. This uncertainty could be related to the use of different drugs or to the examination of patients with various lipid profiles or apoE genotypes. However, these studies have suggested that apoE concentrations are more critical than apoE kinetics and provide more evidence for the role of apoE in apo(a)-apoB100 binding and modulation. The effect of PCSK9 on Lp(a) could thus be related to its action on apoE metabolism. Changes in VLDL-apoE catabolism through the LDLR and LRP-1 are likely to occur with PCSK9 mutations or inhibitors and could explain the reduction in the plasma

or VLDL apoE concentration and subsequent decrease in the plasma Lp(a) concentration.

This study has some limitations, such as the small numbers of subjects and PCSK9 mutations related to their low prevalence and to limited access to stable isotope kinetic studies in humans. In addition, only one patient exhibited plasma Lp(a) levels beyond the strong cardiovascular risk threshold of 125 nmol/L (ie, 50 mg/dL). Some methodological aspects have to be also acknowledged. Despite our efforts for isolating Lp(a) by immunoprecipitation, we were not able to detect <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-leucine enrichments for Lp(a)-apoB100 and Lp(a)-apoE, which would be of interest for validating our hypothesis. Another hurdle, unrelated to the MS technology, is the exchange of apoE between lipoproteins and its possible shedding off of the lipoprotein surface by ultracentrifugation, which could lead to biases for the accurate determination of apoE pool sizes in lipoproteins.<sup>30</sup> Finally, several protocols can be employed for stable isotope kinetic studies such fasting versus fed states or bolus versus primed constant infusion of labeled tracer.<sup>52</sup> The primed constant infusion that we used here presents some disadvantages to estimate kinetics of apolipoproteins with relatively slower turnover rates such as that of Lp(a)-apo(a). Therefore, labeled tracers have tended to be administered as a bolus and the duration of the experimental protocols extended to 96 hours as previously described for Lp(a) kinetics.<sup>53</sup> Such differences in experimental protocols lead to contrasted kinetic parameters for Lp(a)-apo(a).

Hence, our study is observational and aimed to generate new hypotheses for Lp(a) metabolism. Our findings need to be investigated further with in vitro or in vivo experiments in patients with elevated Lp(a) plasma

concentrations, and specific interventions involving VLDL-apoE modulation are mandatory to confirm the interaction between apoE and Lp(a) synthesis.

## ARTICLE INFORMATION

Received November 17, 2019; accepted January 21, 2020.

### Affiliations

From the NUN, INRA, CHU Nantes, UMR 1280, PhAN, IMAD, CRNH-O, France (M. Croyal, K.O., S.B.-C., A.A., M.K.); CRNH-O Mass Spectrometry Core Facility, F-44000 Nantes, France (M. Croyal, K.O., T.M., S.B.-C., A.A., M.K.); Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète et athérosclérose Réunion Océan Indien (D. TROI), Plateforme CYROI, Saint-Denis de La Réunion, France (V.B., G.L.); L'institut du thorax, INSERM, CNRS, University of Nantes, France (M. Châteaux, C.L.M.); Biogenouest-Corsaire platform, Saint Gilles, France (L.C.); P2R «Production de protéines recombinantes», CRCINA, SFR-Santé, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, France (K.B.); Pharmacy Department, Nantes University Hospital, France (L.F.); L'institut du thorax, INSERM, CNRS, University of Nantes, CHU Nantes, France (S.H., B.C.); ELSAN, clinique Bretonne, Nantes, France (M.K.); and Nephrology Department, CHU Saint-Pierre, La Réunion, France (E.N.-D.).

### Acknowledgments

We thank the staff of the Clinical Investigation Center of the University Hospital in Nantes, especially Dr Yassine Zair and Eliane Hiverneau for their invaluable help with patients and blood collection. We thank Biogenouest, particularly, the Corsaire network of analytical platforms, for their support of this project.

### Sources of Funding

This work was funded by an Aspire grant from Pfizer. It was also supported by the French national CHOLEsterol Personalized Innovation (CHOPIN) project, funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007) and coordinated by the Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) of Nantes. V. Blanchard is the recipient of a scholarship from La Réunion and the European Union (European Regional Development Fund INTERREG V).

### Disclosures

None.

## REFERENCES

- Tsimikas S. A test in context: lipoprotein(a): diagnosis, prognosis, controversies, and emerging therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:692–711. doi: 10.1016/j.jacc.2016.11.042
- Tsimikas S, Fazio S, Ferdinand KC, Ginsberg HN, Koschinsky ML, Marcovina SM, Moriarty PM, Rader DJ, Remaley AT, Reyes-Soffer G, et al. NHLBI Working group recommendations to reduce lipoprotein(a)-mediated risk of cardiovascular disease and aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:177–192. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.014
- Tada H, Kawashiri MA, Yoshida T, Teramoto R, Nohara A, Konno T, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M, Hayashi K. Lipoprotein(a) in familial hypercholesterolemia with proprotein convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9) Gain-of-Function mutations. *Circ J*. 2016;80:512–518. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0999
- Sabatine MS. PCSK9 inhibitors: clinical evidence and implementation. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16:155–165. doi: 10.1038/s41569-018-0107-8
- Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, Kallend D, Dufour R, Karakas M, Hall T, Troquay RP, Turner T, Visseren FL, et al. Inclisiran in patients at high cardiovascular risk with elevated LDL cholesterol. *N Engl J Med*. 2017;376:1430–1440. doi: 10.1056/NEJMoa1615758
- Raal FJ, Giugliano RP, Sabatine MS, Koren MJ, Blom D, Seidah NG, Honarpour N, Lira A, Xue A, Chiruolu P, et al. PCSK9 inhibition-mediated reduction in Lp(a) with evolocumab: an analysis of 10 clinical trials and the LDL receptor's role. *J Lipid Res*. 2016;57:1086–1096. doi: 10.1194/jlr.P065334
- Ray KK, Stoekenbroek RM, Kallend D, Leiter LA, Landmesser U, Wright RS, Wijngaard P, Kastelein JJP. Effect of an siRNA therapeutic targeting PCSK9 on atherogenic lipoproteins. *Circulation*. 2018;138:1304–1316. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034710
- Cao YX, Liu HH, Li S, Li JJ. A meta-analysis of the effect of PCSK9-monovalent antibodies on circulating lipoprotein (a) levels. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2019;19:87–97. doi: 10.1007/s40256-018-0303-2
- Edmiston JB, Brooks N, Tavori H, Minnier J, Duell B, Purnell JO, Kaufman T, Wojcik C, Voros S, Fazio S, et al. Discordant response of low-density lipoprotein cholesterol and lipoprotein(a) levels to monoclonal antibodies targeting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Clin Lipidol*. 2017;11:667–673. doi: 10.1016/j.jacl.2017.03.001
- Enkhaa B, Anuurad E, Zhang W, Yue K, Li CS, Berglund L. The roles of apo(a) size, phenotype, and dominance pattern in PCSK9-inhibition-induced reduction in Lp(a) with alirocumab. *J Lipid Res*. 2017;58:2008–2016. doi: 10.1194/jlr.M078212
- Hopkins PN, Defesche J, Fouchier SW, Bruckert E, Luc G, Cariou B, Sjouke B, Leren TP, Harada-Shiba M, Mabuchi H, et al. Characterization of autosomal dominant hypercholesterolemia caused by PCSK9 gain of function mutations and its specific treatment with alirocumab, a PCSK9 monoclonal antibody. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:823–831. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001129
- Tsimikas S, Gordts PLSM, Nora C, Yeang C, Witztum JL. Statin therapy increases lipoprotein(a) levels. *Eur Heart J*. 2019. pii: ehz310. doi: 10.1093/eurheartj/ehz310
- Romagnuolo R, Scipione CA, Boffa MB, Marcovina SM, Seidah NG, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) catabolism is regulated by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 through the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 2015;290:11649–11662. doi: 10.1074/jbc.M114.611988
- Villard EF, Thedrez A, Blankenstein J, Croyal M, Tran TT, Poirier B, Le Bail JC, Illiano S, Nobcourt E, Krempf M, et al. PCSK9 modulates the secretion but not the cellular uptake of lipoprotein(a) ex vivo: an effect blunted by alirocumab. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1:419–427. doi: 10.1016/j.jaccbts.2016.06.006
- Rader DJ, Mann WA, Cain W, Kraft HG, Usher D, Zech LA, Hoeg JM, Davignon J, Lupien P, Grossman M. The low density lipoprotein receptor is not required for normal catabolism of Lp(a) in humans. *J Clin Invest*. 1995;95:1403–1408. doi: 10.1172/JCI117794
- Croyal M, Tran TT, Blanchard RH, Le Bail JC, Villard EF, Poirier B, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Ramin-Mangata S, Blanchard V, et al. PCSK9 inhibition with alirocumab reduces lipoprotein(a) levels in nonhuman primates by lowering apolipoprotein(a) production rate. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132:1075–1083. doi: 10.1042/CS20180040
- Reyes-Soffer G, Pavlyha M, Ngai C, Thomas T, Holleran S, Ramakrishnan R, Karmally W, Nandakumar R, Fontanez N, Obunike J, et al. Effects of PCSK9 inhibition with alirocumab on lipoprotein metabolism in healthy humans. *Circulation*. 2017;135:352–362. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025253
- Watts GF, Chan DC, Somaratne R, Wasserman SM, Scott R, Marcovina SM, Barrett PHR. Controlled study of the effect of proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 inhibition with evolocumab on lipoprotein(a) particle kinetics. *Eur Heart J*. 2018;39:2577–2585. doi: 10.1093/eurheartj/ehy122
- Erhart G, Lamina C, Lehtimäki T, Marques-Vidal P, Khera R, Vollenweider P, Raitakari OT, Waeber G, Thorand B, Strauch K, et al. Genetic factors explain a major fraction of the 50% lower lipoprotein(a) concentrations in finns. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38:1230–1231. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310865
- Moriarty PM, Varvel SA, Gordts PL, McConnell JP, Tsimikas S. Lipoprotein(a) mass levels increase significantly according to APOE genotype: an analysis of 431 239 patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:580–588. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308704
- Mack S, Coassin S, Ruedei R, Yousri NA, Seppälä I, Gieger C, Schneringer S, Forer L, Erhart G, Marques-Vidal P, et al.; KORA-Study Group. A genome-wide association meta-analysis on lipoprotein (a) concentrations adjusted for apolipoprotein (a) isoforms. *J Lipid Res*. 2017;58:1834–1844. doi: 10.1194/jlr.M076232
- Blanchard V, Croyal M, Khantalin I, Ramin-Mangata S, Chemello K, Nativel B, Blom DJ, Marais AD, Lambert G. Reduced lipoprotein(a) associated with the apolipoprotein E2 genotype confers cardiovascular protection in familial hypercholesterolemia. *JACC Basic Transl Sci*. 2019;4:425–427. doi: 10.1016/j.jaccbts.2019.03.002
- Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34:154–156. doi: 10.1038/ng1161
- Cariou B, Ouguerram K, Zaïr Y, Guerois R, Langhi C, Kourimate S, Benoit I, Le May C, Gayet C, Belabbas K, et al. PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2191–2197. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.194191
- Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, Boileau C, Magot T, Krempf M. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant

- hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1448–1453. doi: 10.1161/01.ATV.0000133684.77013.88
26. Croyal M, Ouguerram K, Passard M, Ferchaud-Roucher V, Ch viveaux M, Billon-Crossouard S, de Gouville AC, Lambert G, Krempf M, Nob court E. Effects of Extended-Release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2042–2047. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305835
  27. Fr nais R, Ouguerram K, Maugeais C, Marchini JS, Benlian P, Bard JM, Magot T, Krempf M. Apolipoprotein A-I kinetics in heterozygous familial hypercholesterolemia: a stable isotope study. *J Lipid Res*. 1999;40:1506–1511.
  28. Croyal M, Billon-Crossouard S, Goulitquer S, Aguesse A, Le n L, Fall F, Ch viveaux M, Moyon T, Blanchard V, Ouguerram K, et al. Stable Isotope Kinetic Study of ApoM (Apolipoprotein M). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38:255–261. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310208
  29. Croyal M, Fall F, Ferchaud-Roucher V, Ch viveaux M, Zar Y, Ouguerram K, Krempf M, Nob court E. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J Lipid Res*. 2016;57:509–515. doi: 10.1194/jlr.D064618
  30. Blanchard V, Ramin-Mangata S, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Durand M, Chemello K, Nativel B, Flet L, Ch viveaux M, Jacobi D, et al. Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study. *J Lipid Res*. 2018;59:892–900. doi: 10.1194/jlr.P083576
  31. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. 2003;46:733–749. doi: 10.1007/s00125-003-1111-y
  32. Paige E, Masconi KL, Tsimikas S, Kronenberg F, Santer P, Weger S, Willeit J, Kiechl S, Willeit P. Lipoprotein(a) and incident type-2 diabetes: results from the prospective Bruneck study and a meta-analysis of published literature. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16:38. doi: 10.1186/s12933-017-0520-z
  33. Ko HS, Kim CJ, Ryu WS. Effect of fenofibrate on lipoprotein(a) in hypertriglyceridemic patients: impact of change in triglyceride level and liver function. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46:405–411. doi: 10.1097/01.fjc.0000175875.48167.c7
  34. Kettunen J, Demirkan A, W rtz P, Draisma HH, Haller T, Rawal R, Vaarhorst A, Kangas AJ, Lyytik inen LP, Pirinen M, et al. Genome-wide study for circulating metabolites identifies 62 loci and reveals novel systemic effects of LPA. *Nat Commun*. 2016;7:11122. doi: 10.1038/ncomms11122
  35. Ikewaki K, Cain W, Thomas F, Shamburek R, Zech LA, Usher D, Brewer HB Jr, Rader DJ. Abnormal *in vivo* metabolism of apoB-containing lipoproteins in human apoE deficiency. *J Lipid Res*. 2004;45:1302–1311. doi: 10.1194/jlr.M400020-JLR200
  36. Lambert G, Thedrez A, Croyal M, Ramin-Mangata S, Couret D, Diotel N, Nob court-Dupuy E, Krempf M, LeBail JC, Poirier B, et al. The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131:261–268. doi: 10.1042/CS20160403
  37. Watts GF, Chan DC, Dent R, Somaratne R, Wasserman SM, Scott R, Burrows S, R Barrett PH. Factorial effects of evolocumab and atorvastatin on lipoprotein metabolism. *Circulation*. 2017;135:338–351. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025080
  38. Hoover-Plow J, Huang M. Lipoprotein(a) metabolism: potential sites for therapeutic targets. *Metabolism*. 2013;62:479–491. doi: 10.1016/j.metabol.2012.07.024
  39. Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Marcovina SM. Lipoprotein(a) metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25:189–193. doi: 10.1097/MOL.0000000000000070
  40. von Zychlinski A, Williams M, McCormick S, Kleffmann T. Absolute quantification of apolipoproteins and associated proteins on human plasma lipoproteins. *J Proteomics*. 2014;106:181–190. doi: 10.1016/j.jprot.2014.04.030
  41. von Zychlinski A, Kleffmann T, Williams MJ, McCormick SP. Proteomics of Lipoprotein(a) identifies a protein complement associated with response to wounding. *J Proteomics*. 2011;74:2881–2891. doi: 10.1016/j.jprot.2011.07.008
  42. Kritharides L, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Kamstrup PR, Afzal S. Effect of APOE ε genotype on lipoprotein(a) and the associated risk of myocardial infarction and aortic valve stenosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:3390–3399. doi: 10.1210/je.2017-01049
  43. de Knijff P, Kaptein A, Boomsma D, Princen HM, Frants RR, Havekes LM. Apolipoprotein E polymorphism affects plasma levels of lipoprotein(a). *Atherosclerosis*. 1991;90:169–174. doi: 10.1016/0021-9150(91)90111-f
  44. Ritter MM, Gewitsch J, Richter WO, Geiss HC, Wildner MW, Schwandt P. Apolipoprotein E polymorphism has no independent effect on plasma levels of lipoprotein(a). *Atherosclerosis*. 1997;131:243–248. doi: 10.1016/s0021-9150(97)06105-4
  45. Nandakumar R, Matveyenko A, Thomas T, Pavlyha M, Ngai C, Holleran S, Ramakrishnan R, Ginsberg HN, Karmally W, Marcovina SM, et al. Effects of mipomersen, an apolipoprotein B100 antisense, on lipoprotein (a) metabolism in healthy subjects. *J Lipid Res*. 2018;59:2397–2402. doi: 10.1194/jlr.P082834
  46. Millar JS, Brousseau ME, Diffenderfer MR, Barrett PH, Welty FK, Cohn JS, Wilson A, Wolfe ML, Nartsupha C, Schaefer PM, et al. Effects of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor torcetrapib on VLDL apolipoprotein E metabolism. *J Lipid Res*. 2008;49:543–549. doi: 10.1194/jlr.M700268-JLR200
  47. Millar JS, Lassman ME, Thomas T, Ramakrishnan R, Jumes P, Dunbar RL, deGoma EM, Baer AL, Karmally W, Donovan DS, et al. Effects of CETP inhibition with anacetrapib on metabolism of VLDL-TG and plasma apolipoproteins C-II, C-III, and E. *J Lipid Res*. 2017;58:1214–1220. doi: 10.1194/jlr.M074880
  48. Oikawa S, Yamashita S, Nakaya N, Sasaki J, Kono S; Effect of Fenofibrate and Ezetimibe Combination Treatment on Lipid (EFECTL) Study Investigators. Efficacy and safety of long-term coadministration of fenofibrate and ezetimibe in patients with combined hyperlipidemia: results of the EFECTL Study. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24:77–94. doi: 10.5551/jat.35626
  49. Ooi EM, Ng TW, Watts GF, Chan DC, Barrett PH. Effect of fenofibrate and atorvastatin on VLDL apoE metabolism in men with the metabolic syndrome. *J Lipid Res*. 2012;53:2443–2449. doi: 10.1194/jlr.P029223
  50. Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Veilleux L, Rodriguez C, Barrett PH, Dubreuil D, Roy M, Bernier L, et al. Effect of atorvastatin on plasma apoE metabolism in patients with combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2002;43:1464–1471. doi: 10.1194/jlr.M200016-jlr200
  51. Bach-Ngohou K, Ouguerram K, Fr nais R, Maug re P, Ripolles-Piquer B, Zar Y, Krempf M, Bard JM. Influence of atorvastatin on apolipoprotein E and AI kinetics in patients with type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;315:363–369. doi: 10.1124/jpet.105.085522
  52. Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J Lipid Res*. 2006;47:1607–1619. doi: 10.1194/jlr.R600017-JLR200
  53. Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Pang J, Tenneti VS, Hamilton SJ, McCormick SP, Marcovina SM, Barrett PH. Effects of extended-release niacin on the postprandial metabolism of Lp(a) and ApoB-100-containing lipoproteins in statin-treated men with type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2686–2693. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306136

## **SUPPLEMENTAL MATERIALS**

### **Very-low-density lipoprotein-apolipoprotein E may influence lipoprotein (a) synthesis or assembly**

**Authors** – Mikaël Croyal<sup>1,2\*</sup>, PhD; Valentin Blanchard<sup>3\*</sup>, MSc; Khadija Ouguerram<sup>1,2</sup>, PhD; Maud Chétiveaux<sup>4</sup>, PhD; Léa Cabioch<sup>5</sup>, PhD; Thomas Moyon, MSc<sup>2</sup>; PhD; Stéphanie Billon-Crossouard<sup>1,2</sup>, BSc; Audrey Aguesse<sup>1,2</sup>, BSc; Karine Bernardeau<sup>6</sup>, PhD; Cédric Le May<sup>4</sup>, PhD; Laurent Flet<sup>7</sup>, PharmD; Gilles Lambert<sup>3</sup>, PhD; Samy Hadjadj<sup>8</sup>, MD, PhD; Bertrand Cariou<sup>8</sup>, MD, PhD; Michel Krempf<sup>1,2,9</sup>, MD, PhD; Estelle Nobécourt-Dupuy<sup>10</sup>, MD, PhD.

\* These authors contributed equally to the study

**Affiliations.** <sup>1</sup>NUN, INRA, CHU Nantes, UMR 1280, PhAN, IMAD, CRNH-O, F-44000 Nantes, France. <sup>2</sup>CRNH-O Mass Spectrometry Core Facility, F-44000 Nantes, France. <sup>3</sup>Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DéTROI), Plateforme CYROI, Saint-Denis de La Réunion, France; <sup>4</sup>L'institut du thorax, INSERM, CNRS, University of Nantes, Nantes, France. <sup>5</sup>Biogenouest-Corsaire platform, Saint Gilles, France. <sup>6</sup>P2R «Production de protéines recombinantes», CRCINA, SFR-Santé, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France. <sup>7</sup>Pharmacy Department, Nantes University Hospital, Nantes, France. <sup>8</sup>L'institut du thorax, INSERM, CNRS, University of Nantes, CHU Nantes, Nantes, France. <sup>9</sup>ELSAN, clinique Bretéché, Nantes, France. <sup>10</sup>Nephrology Department, CHU Saint-Pierre, La Réunion, France.

**Corresponding author** – Dr Mikaël Croyal - 8 quai Moncousu, F-44000 Nantes, France - Phone: +33(0) 240 083 073 - E-mail: mikael.croyal@univ-nantes.fr.

**Supplemental Table I** – Apolipoprotein molar concentrations in lipoproteins. Values are expressed in nmol/L.

Patient	HDL				VLDL				LDL				Lp(a)			
	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)
PCSK9-LOF 1	47805	nd	631	5	nd	43	178	nd	nd	682	10	11	nd	19	12	17
PCSK9-LOF 2	59587	nd	532	21	nd	51	131	nd	nd	376	9	nd	nd	15	6	14
PCSK9-LOF 3	62335	nd	617	14	nd	41	178	nd	nd	313	11	nd	nd	10	7	10
<b>Mean</b>	<b>56576</b>	<b>na</b>	<b>594</b>	<b>13</b>	<b>na</b>	<b>45</b>	<b>163</b>	<b>na</b>	<b>na</b>	<b>457</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>na</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>13</b>
<b>SD</b>	<b>7719</b>	<b>na</b>	<b>54</b>	<b>8</b>	<b>na</b>	<b>5</b>	<b>27</b>	<b>na</b>	<b>na</b>	<b>197</b>	<b>1</b>	<b>na</b>	<b>na</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
PCSK9-GOF 1	35514	nd	813	24	nd	150	628	nd	nd	2242	23	nd	nd	14	9	14
PCSK9-GOF 2	33857	nd	981	5	nd	337	651	nd	nd	2086	21	12	nd	18	7	18
PCSK9-GOF 3	35733	nd	1242	30	nd	195	701	2	nd	1969	25	3	nd	33	16	27
PCSK9-GOF 4*	37501	nd	1284	60	nd	439	736	6	nd	1956	23	52	nd	126	217	111
<b>Mean</b>	<b>35651</b>	<b>na</b>	<b>1080</b>	<b>30</b>	<b>na</b>	<b>280</b>	<b>679</b>	<b>4</b>	<b>na</b>	<b>2063</b>	<b>23</b>	<b>22</b>	<b>na</b>	<b>48</b>	<b>62</b>	<b>43</b>
<b>SD</b>	<b>1490</b>	<b>na</b>	<b>223</b>	<b>23</b>	<b>na</b>	<b>132</b>	<b>49</b>	<b>3</b>	<b>na</b>	<b>133</b>	<b>2</b>	<b>26</b>	<b>na</b>	<b>53</b>	<b>103</b>	<b>46</b>
FH-LDLR 1	32874	nd	722	46	nd	174	1104	8	nd	3003	34	107	nd	172	359	165
FH-LDLR 2	32276	nd	686	16	nd	138	514	nd	nd	3783	17	nd	nd	9	5	8
FH-LDLR 3	33968	nd	834	89	nd	127	879	6	nd	2554	35	25	nd	106	290	101
FH-LDLR 4	34970	nd	588	7	nd	90	488	nd	nd	3276	12	1	nd	8	6	7
FH-LDLR 5	34604	nd	1393	6	nd	123	628	nd	nd	4036	21	5	nd	11	2	11
<b>Mean</b>	<b>33738</b>	<b>na</b>	<b>845</b>	<b>33</b>	<b>na</b>	<b>130</b>	<b>723</b>	<b>7</b>	<b>na</b>	<b>3330</b>	<b>24</b>	<b>35</b>	<b>na</b>	<b>61</b>	<b>132</b>	<b>58</b>
<b>SD</b>	<b>1141</b>	<b>na</b>	<b>319</b>	<b>35</b>	<b>na</b>	<b>30</b>	<b>263</b>	<b>1</b>	<b>na</b>	<b>595</b>	<b>10</b>	<b>49</b>	<b>na</b>	<b>75</b>	<b>177</b>	<b>72</b>

**Supplemental Table I – Continued.**

Patient	HDL				VLDL				LDL				Lp(a)			
	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)
CTL 1	42380	nd	886	7	nd	45	301	nd	nd	1536	14	4	nd	12	5	10
CTL 2	33406	nd	799	12	nd	51	315	nd	nd	996	12	1	nd	12	6	10
CTL 3	33691	nd	473	11	nd	107	96	nd	nd	2098	3	1	nd	11	3	10
CTL 4	35649	nd	1212	44	nd	140	333	2	nd	1589	9	1	nd	39	48	36
CTL 5	47560	nd	987	18	nd	119	315	1	nd	1377	11	4	nd	22	7	19
CTL 6	41464	nd	512	1	nd	164	193	nd	nd	704	4	3	nd	5	1	4
<b>Mean</b>	<b>39025</b>	<b>na</b>	<b>811</b>	<b>16</b>	<b>na</b>	<b>104</b>	<b>259</b>	<b>2</b>	<b>na</b>	<b>1383</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>na</b>	<b>17</b>	<b>12</b>	<b>15</b>
<b>SD</b>	<b>5683</b>	<b>na</b>	<b>283</b>	<b>15</b>	<b>na</b>	<b>48</b>	<b>94</b>	<b>1</b>	<b>na</b>	<b>487</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>na</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>12</b>

HDL, high-density lipoprotein; VLDL, very-low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein (a); Apo, apolipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; LOF, loss of function; na: not applicable; nd, not detected; SD, standard deviation; GOF, gain of function; FH-LDLR, familial hypercholesterolemia with mutation of low-density lipoprotein receptor; CTL, control. \*PCSK9-GOF 4 is a carrier of the R218S mutation, other patients with PCSK9 GOF mutations are carriers of the S127R mutation.

**Supplemental Table II – Recoveries of apolipoproteins after lipoprotein isolation by ultracentrifugation (VLDL, LDL and HDL) or immunoprecipitation (Lp(a)). Values are expressed in % of total plasma contents.**

	ApoA-I	ApoB100	ApoE	Apo(a)
<b>HDL</b>	96 ± 5	nd	61 ± 27	66 ± 23
<b>VLDL</b>	nd	7 ± 4	35 ± 25	nd
<b>LDL</b>	nd	88 ± 24	1 ± 1	31 ± 30
<b>Lp(a)</b>	nd	2 ± 1	4 ± 9	82 ± 22

HDL, high-density lipoprotein; VLDL, very-low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein (a); Apo, apolipoprotein.

**Supplemental Table III – Multiple correlations between VLDL-apoB100, LDL-apoB100, VLDL-apoE and Lp(a)-apo(a) kinetic parameters.** Values are presented as *r* (*p*) values (Spearman test).

	VLDL-apoB	VLDL-apoB FCR	VLDL-apoB100 APR	LDL-apoB	LDL-apoB FCR	LDL-apoB APR	VLDL-apoE	VLDL-apoE FCR	VLDL-apoE APR	Lp(a)-apo(a)	Lp(a)-apo(a) FCR
<b>VLDL-apoB</b>											
<b>VLDL-apoB FCR</b>	-0.55 (0.019)										
<b>VLDL-apoB APR</b>	ns	0.57 (0.014)									
<b>LDL-apoB</b>	ns	ns	ns								
<b>LDL-apoB FCR</b>	-0.61 (0.007)	0.58 (0.011)	ns	-0.86 (<0.001)							
<b>LDL-apoB APR</b>	ns	ns	ns	ns	ns						
<b>VLDL-apoE</b>	0.73 (0.001)	-0.47 (0.050)	ns	0.65 (0.004)	-0.80 (<0.001)	ns					
<b>VLDL-apoE FCR</b>	-0.49 (0.037)	ns	ns	-0.64 (0.005)	0.74 (<0.001)	ns	-0.73 (0.001)				
<b>VLDL-apoE APR</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.50 (0.033)	ns			
<b>Lp(a)-apo(a)</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.57 (0.011)	ns	0.48 (0.045)		
<b>Lp(a)-apo(a) FCR</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.57 (0.013)	ns	ns	
<b>Lp(a)-apo(a) APR</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.63 (0.005)	ns	0.50 (0.035)	0.95 (<0.001)	0.56 (0.016)

VLDL, very-low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein (a); apo, apolipoprotein; conc., concentration; FCR, fractional catabolic rate; APR, absolute production rate; ns, non-significant.

**Supplemental Table IV – Effects of extended-release niacin (ERN) on main biochemical parameters of patients (n = 8).** Values are means of fold change (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

Parameter	Baseline levels	Effect of ERN	Mean change (%)	p
TC	215 ± 59 mg/dL	↓	-15.8	0.008
TG	221 ± 67 mg/dL	↓	-43.6	0.023
LDL-C	128 ± 45 mg/dL	↓	-16.4	0.039
HDL-C	41 ± 13 mg/dL	↑	+22.7	0.008
ApoA-I	131 ± 24 mg/dL	=	+4.6	0.531
ApoB100	104 ± 29 mg/dL	↓	-20.8	0.008
VLDL-apoB100	10 ± 4 mg/dL	=	-16.3	0.156
LDL-apoB100	58 ± 19 mg/dL	=	-12.2	0.211
ApoE	7.4 ± 1.5 mg/dL	=	-14.3	0.195
VLDL-apoE	1.7 ± 0.7 mg/dL	↓	-42.1	0.008
HDL-apoE	3.6 ± 1.8 mg/dL	=	-8.1	0.195
PCSK9	269 ± 70 mg/dL	↓	-34.7	0.008
Apo(a)	54 ± 15 nmol/L	↓	-19.8	0.008

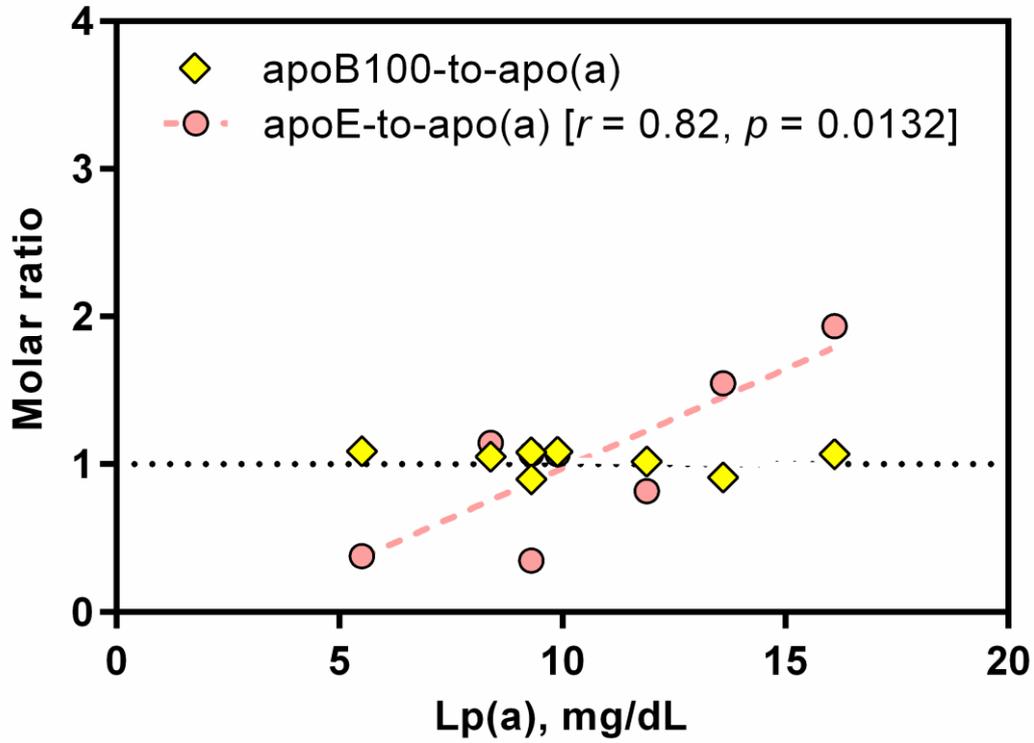
TC, total cholesterol; TG, triglyceride; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; Apo, apolipoprotein; VLDL, very-low-density lipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9.

**Supplemental Table V – Multiple correlations between apoE and apo(a) kinetic parameter changes after extended-release niacin treatment.** Values are presented as  $r$  ( $p$ ) values (Spearman test).

Parameter	Plasma conc.	apoE	VLDL-apoE conc.	VLDL-apoE FCR	VLDL-apoE APR	Lp(a)-apo(a) conc.	Lp(a)-apo(a) FCR	Lp(a)-apo(a) APR	PCSK9 conc.
Plasma apoE conc.									
VLDL-apoE conc.	ns								
VLDL-apoE FCR	ns	ns							
VLDL-apoE APR	ns	ns	0.76 (0.037)						
Lp(a)-apo(a) conc.	ns	ns	0.79 (0.028)	ns					
Lp(a)-apo(a) FCR	ns	ns	ns	ns	ns				
Lp(a)-apo(a) APR	ns	ns	ns	0.83 (0.015)	ns	0.91 (0.005)			
PCSK9 conc.	ns	ns	ns	0.79 (0.028)	ns	ns	ns	ns	

VLDL, very-low-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein (a); apo, apolipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; conc., concentration; FCR, fractional catabolic rate; APR, absolute production rate; ns, non-significant.

**Supplemental Figure I – Lipoprotein (a) composition.** ApoB100-to-apo(a) and apoE-to-apo(a) molar ratios in lipoprotein (a), isolated by immunoprecipitation (Spearman test). ERN study at baseline.



## **Discussion et perspectives**

Nous avons montré par deux études parallèles que les voies métaboliques de l'apoE des VLDL et de la Lp(a) pourraient être liées. Dans un premier temps, nous avons observé que les concentrations de Lp(a) étaient plus élevées chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (mutations GOF de PCSK9 et du LDLR), par rapport aux individus sains et aux patients porteurs de mutations LOF de PCSK9. Ce phénomène serait principalement expliqué par le taux de production d'apo(a) étant donné qu'aucune différence n'a été observée sur les taux cataboliques, excluant ainsi le rôle du LDLR dans la clairance de la Lp(a). Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études montrant que les niveaux de Lp(a) sont régulés majoritairement par son taux de production (Villard et al., 2016; Rader et al., 1994; Knight, 1994). A l'exception de la taille de l'apo(a) ( $r = -0,64$  ;  $p = 0,004$ ), seules les concentrations d'apoE plasmatiques et des VLDL étaient corrélées significativement à la vitesse de production de la Lp(a) ( $r = 0,60$  ;  $p = 0,009$  et  $r = 0,63$  ;  $p = 0,005$ , respectivement). La corrélation positive observée entre la vitesse de production de l'apoE des VLDL avec la concentration plasmatique de Lp(a) ( $r = 0,48$  ;  $p = 0,045$ ) et son taux de production ( $r = 0,50$  ;  $p = 0,035$ ), suggère que l'apoE des VLDL participe à la sécrétion d'apo(a) ou de Lp(a) dans le plasma. De manière surprenante, les taux de catabolisme de l'apoE des VLDL et de la Lp(a) étaient également associés ( $r = 0,57$  ;  $p = 0,013$ ). En analysant spécifiquement la fraction de Lp(a) isolée par immuno-précipitation, nous avons également constaté que le nombre de molécules d'apoE liées à la Lp(a) était corrélé positivement aux concentrations plasmatiques de Lp(a) ( $r = 0,96$  ;  $p < 0,0001$ ) mais pas avec les concentrations de PCSK9. Cette observation renforce l'hypothèse d'un lien métabolique fort entre apoE et Lp(a).

La seconde étude réalisée sur les patients traités à la niacine a confirmé les résultats précédents. La diminution de la vitesse de production de l'apoE des VLDL induite par la niacine était fortement corrélée avec la diminution du taux de production de la Lp(a) ( $r = 0,83$  ;  $p = 0,015$ ) mais aussi avec la diminution des concentrations de PCSK9 ( $r = 0,79$  ;  $p = 0,028$ ). En revanche, nous n'avons pas observé de corrélation significative entre la diminution de la vitesse de production de la Lp(a) et la diminution des concentrations de PCSK9 induites par la niacine. À noter cependant que la p value était proche de la significativité ( $r = 0,69$  ;  $p = 0,070$ ).

La limite majeure de cette étude réside à nouveau dans le faible nombre de patients étudiés, notamment en raison de la très faible prévalence des mutations GOF et LOF de PCSK9 et des difficultés de mise en place des protocoles cinétiques. A noter cependant que malgré le faible nombre de patients, nous avons confirmé que les patients présentant des mutations GOF de PCSK9 et du LDLR présentaient des taux cataboliques réduits de l'apoB100 des LDL par rapport aux contrôles. A l'inverse, les patients présentant des mutations LOF de PCSK9 avaient des taux cataboliques augmentés de l'apoB100 des LDL. Par ailleurs, les taux cataboliques de l'apoB100 des LDL étaient inversement corrélés aux concentrations de PCSK9 ce qui a permis de valider le modèle expérimental. En revanche, nous n'avons pas pu mesurer les enrichissements spécifiques de l'apoE et de l'apoB100 dans la Lp(a) isolée par immunoprécipitation, ce qui nous a privé de données précieuses pour renforcer nos observations. Nous ne pouvons pas non plus exclure des biais associés à l'ultracentrifugation et au métabolisme particulier de l'apoE. En effet, l'apoE est une apolipoprotéine faiblement fixée aux lipoprotéines et échangeable entre les différentes fractions lipoprotéiques (VLDL/IDL ↔ HDL). Les enrichissements mesurés pour l'apoE pourraient donc être légèrement biaisés. Des investigations *in vitro* et *in vivo* supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer avec certitude nos observations.

Il est important de noter que les résultats mis en évidence ici ne reflètent pas intégralement la relation qui existe entre l'apoE et la Lp(a). En effet, tous les patients étudiés étaient homozygotes pour l'apoE3 à l'exception d'un patient E3/E4, ce qui suggère que l'apoE régule les niveaux de Lp(a) selon deux voies distinctes : l'une impliquant l'apoE et ses concentrations plasmatiques et/ou lipoprotéiques et l'autre impliquant son polymorphisme.

## Article 4

# Reduced Lipoprotein (a) associated with the apolipoprotein E2 genotype confers cardiovascular protection in familial hypercholesterolemia

Blanchard V, Croyal M, Khantalin I, Ramin-Mangata S, Chemello K, Nativel B, Blom D, Marais D and Lambert G.

*JACC Basic Transl Sci (letters)*. 2019 Jun 24;4(3):425-427.

### Résumé

De nombreuses études ont montré que les trois isoformes majoritaires de l'apoE (apoE2, apoE3 et apoE4) avaient une influence majeure sur les concentrations de Lp(a) (Erhart et al., 2018; Kritharides et al., 2017; Moriarty et al., 2017; de Knijff et al., 1991; Mack et al., 2017). Une méta-analyse réalisée sur 431 239 individus de la population générale indique que les niveaux moyens de Lp(a) sont 65% plus élevés chez les individus E4/E4 par rapport aux individus E2/E2. D'autres études n'ont cependant observé aucun effet de l'apoE4 par rapport à l'apoE3 sur les taux de Lp(a) après ajustement sur l'âge, le sexe ou les paramètres lipidiques (Kritharides et al., 2017). Par ailleurs, l'apoE2 est associée à de plus faibles concentrations de LDL cholestérol et d'apoB100 que l'apoE3, avec un effet fortement marqué pour les phénotypes homozygotes E2/E2. A l'inverse, les concentrations de LDL cholestérol et d'apoB100 sont légèrement plus élevées en présence d'apoE4 que d'apoE3 (Moriarty et al., 2017; Khan et al., 2013). Aucune étude n'a encore démontré comment les isoformes de l'apoE régulent les niveaux de Lp(a).

Les isoformes de l'apoE ont aussi une influence sur la survenue du risque cardiovasculaire. Une étude a révélé que, dans la population générale, le phénotype E2/E2 est associé à une réduction de 20% du risque de coronaropathies par rapport au phénotype E3/E3. Cette association serait due à des taux de LDL cholestérol réduits chez les individus E2/E2 (Bennet et al., 2007). Toujours dans la population générale, le risque cardiovasculaire lié à la Lp(a) ne semble pas

être influencé par le génotype *APOE* ce qui suggère que la réduction du risque cardiovasculaire associé à l'apoE2 n'est pas causale (Kritharides et al., 2017).

L'objectif de cette étude était d'étudier l'association entre le phénotype apoE, les niveaux de Lp(a) et le risque cardiovasculaire chez des patients présentant naturellement un risque cardiovasculaire élevé. Pour cela, nous avons déterminé le phénotype apoE ainsi que les concentrations plasmatiques d'apo(a), d'apoE et d'apoB100 par LC-MS/MS, dans une cohorte de 444 patients **non traités** atteints d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote (mutation du *LDLR*). Les paramètres lipidiques ont également été mesurés à partir de plasma collecté avant la prise d'un traitement hypolipémiant. Nous avons ensuite évalué l'incidence cardiovasculaire associée au phénotype apoE *via* un modèle multivarié de Cox et une représentation univariée de Kaplan-Meier.

Nous avons démontré que le temps de survie cardiovasculaire était significativement plus long chez les patients porteurs d'apoE2 (E2/E2 et E2/E3) par rapport aux patients homozygotes E3/E3. Cette cardioprotection conférée par l'apoE2 résultait, au moins en partie, d'une diminution des niveaux de Lp(a) mesurés chez les porteurs de cette isoforme.

## Letters

### Reduced Lipoprotein(a) Associated With the Apolipoprotein E2 Genotype Confers Cardiovascular Protection in Familial Hypercholesterolemia



lipoprotein (HDL) cholesterol ( $1.3 \pm 0.2$  mmol/l), LDL cholesterol ( $7.0 \pm 1.9$  mmol/l), apo A-I ( $96 \pm 28$  mg/dl), apo B ( $155 \pm 50$  mg/dl), apo E ( $6.4 \pm 2.8$  mg/dl), and apo(a)/Lp(a) ( $52 \pm 48$  nmol/l) were typical of a heterozygous FH phenotype. One-third (32.9%) of these patients had experienced at least 1 cardiovascular event before the initial visit.

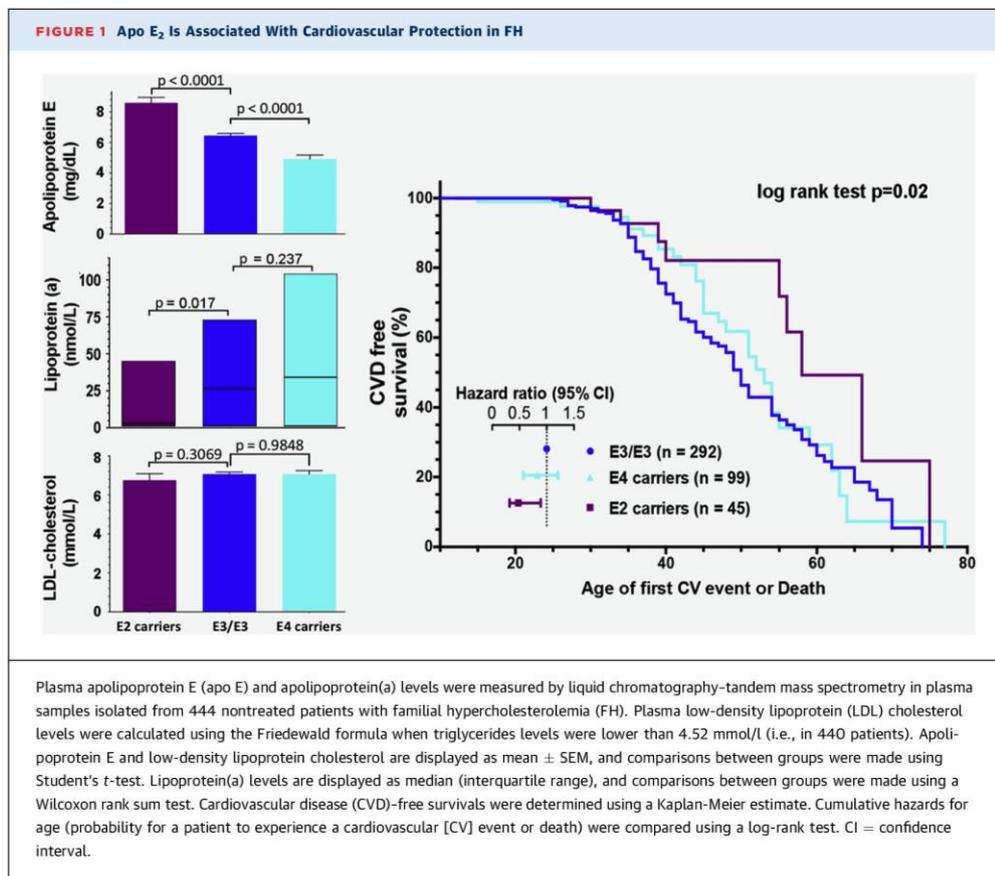
There are 3 isoforms of apolipoprotein E (apo E) in humans ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , and  $\epsilon 4$ ). They differ by single amino acid substitutions that variably affect their affinity for the low-density lipoprotein receptor (LDLR) and for the LDLR-related protein (LRP1), with  $\epsilon 2$  having the weakest binding to these receptors (1). The plasma levels of lipoprotein(a) [Lp(a)], a highly atherogenic LDL-like lipoprotein species, are influenced by the polymorphism of apo E, with  $\epsilon 2/\epsilon 2$  and  $\epsilon 4/\epsilon 4$  carriers presenting with the lowest and highest Lp(a) plasma concentrations, respectively (1).

The majority of these patients were  $\epsilon 3/\epsilon 3$  carriers ( $n = 292$ ) and served as the control group carriers. The remaining patients were  $\epsilon 3/\epsilon 4$  ( $n = 79$ ),  $\epsilon 2/\epsilon 3$  ( $n = 42$ ),  $\epsilon 4/\epsilon 4$  ( $n = 20$ ),  $\epsilon 2/\epsilon 4$  ( $n = 8$ ), or  $\epsilon 2/\epsilon 2$  ( $n = 3$ ). The  $\epsilon 2/\epsilon 4$  carriers were excluded from all subsequent analyses. Compared with  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2$  carriers (i.e.,  $\epsilon 2/\epsilon 3$  and  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ) had increased plasma apo E levels, whereas  $\epsilon 4$  carriers (i.e.,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  and  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) had reduced plasma apo E levels (Figure 1). LDL cholesterol levels were similar in all groups (Figure 1), as well as non-HDL cholesterol levels (not shown). In contrast,  $\epsilon 2$  carriers had significantly reduced Lp(a) concentrations (median 3 nmol/l [interquartile range (IQR): 0 to 45 nmol/l]) compared with  $\epsilon 3/\epsilon 3$  homozygotes (median 27 nmol/l [IQR: 0 to 73 nmol/l]). Lp(a) concentrations were slightly but not significantly increased in  $\epsilon 4$  carriers (median 34 nmol/l [IQR: 0 to 104 nmol/l]) compared with the  $\epsilon 3/\epsilon 3$  control group (Figure 1). The detection limit for apo(a) measurement by liquid chromatography-tandem mass spectrometry was 2 nmol/l (6). All patients with apo(a) levels lower than this limit were reported as having Lp(a) concentrations of 0 nmol/l. Thus, 48% of  $\epsilon 2$  carriers, 28% of  $\epsilon 3/\epsilon 3$  carriers, and 25% of  $\epsilon 4$  carriers had Lp(a) levels lower than the detection limit. Given that Lp(a) levels are strongly influenced by the polymorphism of apo(a) resulting from the presence of a variable number of kringle IV<sub>2</sub> repeats in humans (1 to more than 40) (3), we verified that the number of kringle IV repeats on apo(a) was similar in  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2$ , and  $\epsilon 4$  carriers, on average at a mean  $\pm$  SD of  $21.7 \pm 7.2$ ,  $20.6 \pm 8.6$ , and  $20.4 \pm 7.0$  ( $p = 0.196$ ), respectively, thus ruling out a chance finding.

Lp(a) contains a highly polymorphic signature protein, apolipoprotein(a) [apo(a)], bound to the apolipoprotein B100 (apo B100) of an LDL particle. The proatherogenic properties of Lp(a) are mediated by its LDL moiety rich in cholesterol, as well as by its elevated content in proinflammatory oxidized phospholipids, and by the antifibrinolytic effects of its plasminogen-like apo(a) moiety. Elevated Lp(a) is an independent predictor of cardiovascular disease (CVD), particularly for patients with familial hypercholesterolemia (FH) (2,3).

To evaluate whether the modulation of Lp(a) levels by apo E isoforms affects CVD risk, we assessed apo E and apo(a) concentrations, as well as polymorphisms, in a cohort of patients at very high cardiovascular risk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (4). These parameters were measured in plasma samples collected at the first visit from 444 nontreated heterozygous patients with FH (all genetically confirmed carriers of a single mutated *LDLR* allele) attending the lipid clinic at Groote Schuur Hospital in Cape Town, South Africa (5). Their mean  $\pm$  SD plasma levels of total cholesterol ( $8.9 \pm 2.0$  mmol/l), triglycerides ( $1.5 \pm 0.9$  mmol/l), high-density

These results confirm specifically in patients with FH a landmark observation made in the general population showing that apo E<sub>2</sub> is associated with reduced Lp(a) (1). Whether LDLR or LRP1 plays a role in that process is unknown. The mechanism by which apo E<sub>2</sub> specifically reduces Lp(a) clearly remains to be established. The percentage of patients with FH who had CVD was significantly less in  $\epsilon 2$  carriers than



in  $\epsilon 3/\epsilon 3$  carriers (20% vs. 37%;  $p = 0.021$ ) and intermediate in  $\epsilon 4$  carriers (31%).

The reduced rate of CVD in  $\epsilon 2$  carriers remained significant after adjustment for age, sex, tobacco use, body mass index, diabetes, HDL cholesterol, hypertension, and LDLR mutation status. We next performed a Kaplan-Meier estimate to determine the CVD-free survival time according to apo E genotypes (Figure 1). The CVD-free survival time was significantly longer in patients with FH carrying one  $\epsilon 2$  allele compared with  $\epsilon 3/\epsilon 3$  carriers (hazard ratio: 0.48 [95% confidence interval (CI): 0.32 to 0.89];  $p = 0.02$ ). In contrast, patients carrying one  $\epsilon 4$  allele had similar CVD-free survival time as  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (hazard ratio: 0.84 [95% CI: 0.57 to 1.21];  $p = 0.35$ ). It is far-fetched to speculate that the apparent lack of increase in CVD in  $\epsilon 4$  carriers may relate to the similar levels of Lp(a) observed in  $\epsilon 4$  carriers and  $\epsilon 3/\epsilon 3$  homozygotes in the present study.

These results are unique in that we investigated patients at very high cardiovascular risk, and none of

these patients were taking lipid-lowering medication at the time of their first visit (5), we were able to demonstrate that apo E<sub>2</sub> confers a significant degree of cardioprotection. Unlike non-FH subjects, who have variable effects of apo E genotypes on LDL cholesterol (1), apo E<sub>2</sub> did not significantly reduce LDL in our FH cohort, thus indicating that the cardioprotection observed here stems, at least in part, from the lowering of Lp(a).

There are some limitations to our study, in particular the lack of data on the ethnic background of our patients. However, our results clearly underpin that Lp(a) should be measured systematically in all patients with FH, given that with progressively more effective pharmacological LDL reduction, Lp(a) becomes a strong predictor of CVD (3) and, as such, an important driver of residual CVD risk.

Valentin Blanchard, BS  
Mikaël Croyal, PhD

Ilya Khantalın, MD  
Stéphane Ramin-Mangata, BS  
Kévin Chemello, BS  
Brice Nativel, PhD  
Dirk J. Blom, MD, PhD  
A. David Marais, MD  
\*Gilles Lambert, PhD

\*Inserm UMR 1188  
Plateforme CYROI  
2 rue Maxime Rivière  
97490 Sainte Clotilde, France

E-mail: [gilles.lambert@univ-reunion.fr](mailto:gilles.lambert@univ-reunion.fr)  
<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.03.002>

Please note: This work was funded by the program grant CHOPIN (Cholesterol Personalized Innovation) granted by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007). The authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose. Mr. Blanchard and Dr. Croyal contributed equally to this work and are joint first authors.

All authors attest they are in compliance with human studies committees and animal welfare regulations of the authors' institutions and Food and Drug Administration guidelines, including patient consent where appropriate. For

more information, visit the *JACC: Basic to Translational Science* author instructions page.

#### REFERENCES

1. Moriarty PM, Varvel SA, Gordts PL, McConnell JP, Tsimikas S. Lipoprotein(a) mass levels increase significantly according to APOE genotype: an analysis of 431 239 patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:580-8.
2. Alonso R, Andres E, Mata N, et al. Lipoprotein(a) levels in familial hypercholesterolemia: an important predictor for cardiovascular disease independent of the type of LDL-receptor mutation. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:1982-9.
3. Willeit P, Ridker PM, Nestel PJ, et al. Baseline and on-statin treatment lipoprotein(a) levels for prediction of cardiovascular events: individual patient-data meta-analysis of statin outcome trials. *Lancet* 2018;392:1311-20.
4. Blanchard V, Ramin-Mangata S, Billon-Crossouard S, et al. Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study. *J Lipid Res* 2018;59:892-900.
5. Lambert G, Petrides F, Chatelais M, et al. Elevated plasma PCSK9 level is equally detrimental for patients with nonfamilial hypercholesterolemia and heterozygous familial hypercholesterolemia, irrespective of low-density lipoprotein receptor defects. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2365-73.
6. Croyal M, Ouguerram K, Passard M, et al. Effects of extended-release nicotinic acid on apolipoprotein (a) kinetics in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:2042-7.

## **Discussion et perspectives**

Un tiers des patients inclus à cette étude a été victime d'événements cardiovasculaires avant leur première visite à l'hôpital. Parmi ces 444 patients, nous avons identifié 292 E3/E3, 79 E3/E4, 42 E2/E3, 20 E4/E4, 8 E2/E4 et 3 E2/E2. Pour faciliter l'interprétation de nos données, nous avons exclu les patients E2/E4 des analyses. Nous avons démontré que les patients porteurs des phénotypes E2/E2 et E2/E3 présentaient un risque cardiovasculaire réduit par rapport aux patients porteurs du phénotype E3/E3. Cette cardioprotection se traduit par un nombre d'événements cardiovasculaires significativement plus faible ( $p = 0,021$ ) pour les phénotypes à apoE2 (20%) par rapport aux phénotypes E3/E3 (37%). Elle se traduit également par un temps de survie (courbe de Kaplan-Meier) sans complication cardiovasculaire plus long pour les patients porteurs de l'isoforme apoE2 par rapport aux patients E3/E3 (hazard ratio = 0,48 ; intervalle de confiance : 0,32-0,89,  $p = 0,02$ ). Ces constatations pourraient en partie être la conséquence des concentrations de Lp(a) plus faibles chez les patients porteurs de l'apoE2 [médiane (écart interquartile) : 3 (0-45) nmol/L] par rapport aux patients E3/E3 [médiane (écart interquartile) : 27 (0-73) nmol/L]. L'absence de différence significative sur les concentrations de LDL entre les groupes suggère que la cardioprotection associée à l'apoE2 ne provient pas d'une diminution des taux de LDL cholestérol comme cela est généralement observé chez les individus E2/E2 ou E2/E3 (Kritharides et al., 2017; Moriarty et al., 2017; Bennet et al., 2007). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes en termes de taille de l'apo(a), de taux de cholestérol total, de HDL cholestérol, de triglycérides, d'apoB100 et d'apoC-III.

Contrairement à l'apoE2, les porteurs de l'apoE4 (E3/E4 et E4/E4) ne semblent pas plus sujets au risque cardiovasculaire que les individus E3/E3. Par ailleurs, les concentrations médianes d'apo(a) chez les patients porteurs de l'apoE4 [médiane (écart interquartile) : 34 (0-104) nmol/L] n'étaient pas significativement différentes des concentrations médianes des patients E3/E3 [écart interquartile : 27 (0-73) nmol/L].

Les mécanismes par lesquels les isoformes de l'apoE modulent les niveaux de Lp(a) n'ont pas encore été élucidés. Des études suggèrent que la différence d'affinité des trois isoformes pour le LDLR serait à l'origine de ces observations (Kritharides et al., 2017; Moriarty et al., 2017). En présence d'apoE2 (affinité très faible) le LDLR pourrait être plus disponible pour internaliser la Lp(a) qui présente une affinité plus faible que les LDL pour ce récepteur. Cette

hypothèse semble néanmoins peu probable puisque les différences de concentrations de Lp(a) entre les individus sont majoritairement expliquées par des différences de production d'apo(a) (Chan et al., 2019; Ma et al., 2019a, 2019b). Par ailleurs, les patients de cette étude étaient tous atteints d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote et n'avaient pas encore été traités avant leur première visite à l'hôpital. Leurs niveaux de LDL cholestérol étaient donc très élevés (~7 mmol/L). Les LDLR non mutés de ces patients étaient donc fortement sollicités pour l'internalisation massive de cet excès de LDL, au détriment de l'internalisation de la Lp(a). Dans ces conditions, les taux de Lp(a) devraient être similaires quels que soient les phénotypes en apoE. Or, les patients porteurs de l'apoE2, dont les taux de LDL cholestérol étaient aussi élevés que les autres patients, présentaient des concentrations de Lp(a) significativement plus basses que les patients E3/E3 ou que les patients porteurs de l'isoforme E4. Puisque l'apoE est impliquée, comme l'apoB100, dans la production des VLDL, la préférence de l'apoE2 pour les HDL pourrait défavoriser la rencontre d'une lipoprotéine à apoB100 avec l'apo(a) pour former la Lp(a). L'effet de l'apoE2 sur les niveaux de Lp(a) pourrait également avoir lieu dans les hépatocytes, avant la sécrétion d'apo(a) ou de Lp(a) dans le plasma.

Une des limites de notre étude est l'absence d'information concernant l'ethnicité des patients car les taux de Lp(a) varient énormément en fonction des origines ethniques. La deuxième limite majeure réside dans le nombre relativement faible de patients inclus en raison de la très faible prévalence de l'hypercholestérolémie familiale (~1/250). Comme l'apoE2 et l'apoE4 sont relativement peu fréquentes, les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale porteurs de ces isoformes, sont encore plus rares. La stratification des patients en fonction des six phénotypes possibles de l'apoE n'a donc pas pu être réalisée.

Nous avons cependant validé dans une cohorte de patients non traités et atteints d'hypercholestérolémie familiale que l'apoE2 était associée à une réduction du risque cardiovasculaire, vraisemblablement en raison d'une réduction des concentrations de Lp(a) par rapport aux autres phénotypes. Malheureusement, l'effet associé uniquement à l'apoE2 n'a pas pu être évalué statistiquement car seulement trois patients présentaient le phénotype E2/E2. La prévalence de ce phénotype est inférieure à 1% dans la population générale. Une étude cinétique de l'apo(a), de l'apoB100 et de l'apoE chez des patients E2/E2 atteints d'hypercholestérolémie familiale apporterait de précieuses données pour mieux comprendre la relation éventuelle entre l'apoE2 et la Lp(a).

Enfin, il convient de noter qu'un individu E2/E2 sur dix est atteint de dysbêtalipoprotéinémie. Cette dyslipidémie, très rare, se caractérise par une accumulation anormale de chylomicrons et de leurs remnants dans le plasma et une diminution marquée de particules de LDL. Dès lors, la distinction des patients E2/E2 sains des patients E2/E2 atteints de dysbêtalipoprotéinémie apparaît essentielle pour évaluer correctement les niveaux de Lp(a) associés à ce phénotype apoE.

## Article 5

# Recurrent coronary syndromes in a patient with isolated very-high lipoprotein (a) and the prothrombin genetic variant rs1799963 (G20210A): a case report

Khantalin I\*, Blanchard V\*, Viallet N and Lambert G.

\*Equal contribution

*European Heart Journal – Case Reports*. 2019 Jun 24;4(3):425-427.

### Résumé

La variation génétique du gène *LPA* est jusqu'à présent, le facteur de risque génétique le plus important pour les maladies cardiovasculaires. Les petites isoformes d'apo(a) (< 23 KIV) sont associées à des niveaux élevés de Lp(a) et seraient également associées de manière indépendante à un risque accru d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral, d'arthériopathie oblitérante périphérique et de sténose de la valve aortique, par rapport aux grandes isoformes (Langsted et al., 2019b; Saleheen et al., 2017). L'aphérèse constitue aujourd'hui la seule alternative efficace possible contre l'hyper-Lp(a) et le risque cardiovasculaire associé.

Cette étude rapporte le cas d'un homme en bonne santé, sans facteur de risque apparent de maladie cardiovasculaire. Dès l'âge de 32 ans, cet homme a été victime de syndromes coronariens aigus récurrents. Suite à sa prise en charge par le Dr. Kantahlin au CHU Nord de La Réunion (Bellepierre, France), ce patient a fait l'objet de nombreuses investigations. L'angiographie coronarienne a d'abord révélé de multiples lésions athérosclérotiques, notamment au niveau de l'artère coronaire droite, ainsi qu'une sténose sévère et la présence de dépôts de calcium dans l'artère coronaire gauche. L'analyse de ses taux lipidiques n'a révélé aucune anomalie majeure avec une concentration de cholestérol total, de triglycérides, de HDL cholestérol et de LDL cholestérol à 135, 55, 51 et 73 mg/dL respectivement. Son phénotype apoE était E3/E3 et ses concentrations plasmatiques de PCSK9 de 210 ng/mL. Néanmoins des

investigations supplémentaires ont révélé une concentration de Lp(a) extrêmement élevée de 244 mg/dL (~610 nmol/L) associée en plus à la mutation *G20210A* du gène codant pour la prothrombine. Cette mutation augmente le risque de thromboembolisme veineux et d'infarctus du myocarde. Par la suite, ce patient a été traité toutes les deux semaines avec un protocole d'aphasère filtrante. Avant chaque procédure d'aphasère, ses concentrations moyennes de Lp(a) étaient de  $237 \pm 45$  nmol/L ( $95 \pm 18$  mg/dL) et diminuaient drastiquement jusqu'à  $63 \pm 10$  nmol/L ( $25 \pm 3$  mg/dL) après traitement soit une réduction moyenne de 73% par session et de 90% par rapport aux niveaux de bases (610 nmol/L). Depuis le début des sessions d'aphasère, le patient n'a jamais connu de nouvel épisode cardiovasculaire majeur, ni de douleurs thoraciques. De plus, aucune progression de ses lésions athérosclérotiques n'a été enregistrée, témoignant du bénéfice cardiovasculaire lié à la réduction de la Lp(a) par aphasère.



ESC  
European Society  
of Cardiology

European Heart Journal - Case Reports (2019) 3, 1–5  
doi:10.1093/ehjcr/ytz019

**CASE REPORT**  
Coronary heart disease

## Recurrent coronary syndromes in a patient with isolated very-high lipoprotein (a) and the prothrombin genetic variant rs1799963 (G20210A): a case report

Ilya Khantalin<sup>1,2†</sup>, Valentin Blanchard<sup>1†</sup>, Nicolas Viallet<sup>3</sup>, and Gilles Lambert<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de La Réunion, Inserm, UMR 1188 DéTROU, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, France; <sup>2</sup>CHU de La Réunion, Service de Chirurgie Vasculaire, Allée des Topazes, 97400 Saint-Denis, France; and <sup>3</sup>CHU de La Réunion, Service de Néphrologie, Allée des Topazes, 97400 Saint-Denis, France

Received 13 September 2018; accepted 7 February 2019; online publish-ahead-of-print 25 February 2019

### Background

Elevated lipoprotein (a) [Lp(a)] is an under-diagnosed genetically inherited risk factor for coronary heart disease (CHD) and calcific aortic valve stenosis. Premature myocardial infarction (MI) could stem from the association between elevated Lp(a) and other non-traditional cardiovascular risk factors.

### Case summary

Here, we report a male patient with extremely high Lp(a) plasma levels [610 nmol/L (244 mg/dL); normal <75 nmol/L (<30 mg/dL)] associated with the *prothrombin* genetic variant rs1799963 (G20210A) and no other CHD risk factor. At the age of 32, he suffered recurrent episodes of MI treated by coronary angioplasty and drug eluting stents. The patient who was initially prescribed antiplatelet therapy, beta-blockers, and statins, has subsequently been treated by lipoprotein apheresis every fortnight for 43 months. He has never experienced any recurrent episode of angina or chest pain since.

### Discussion

The rare association between extremely elevated circulating Lp(a) levels and prothrombotic genetic variants of coagulation factors appears to be a deadly combination that can only be adequately treated by antiplatelet therapy and lipoprotein apheresis.

### Keywords

Case report • Acute coronary syndromes • Lipoprotein (a) • Prothrombin

### Learning points

- Genetic variants of coagulation factors associated with extremely high lipoprotein (a) [Lp(a)] is a rare and deleterious combination that can lead to recurrent myocardial infarction in young individuals.
- The optimal treatment option appears to be the combined use of antiplatelet therapy and lipoprotein apheresis until drugs specifically aimed at reducing Lp(a), and currently under development, are approved.

\*Corresponding author. Tel: + 262 692 437 708, Fax: + 262 262 938 237, Email: gilles.lambert@univ-reunion.fr

†The first two authors contributed equally to the study.

Handling Editor: Vijay Kunadian

Peer-reviewers: Andras Janosi and Rafael Vidal-Perez

Compliance Editor: Mohammed Majid Akhtar

Supplementary Material Editor: Peregrine Green

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Cardiology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

## Introduction

Lipoprotein (a) [Lp(a)] is regarded as more atherogenic than low-density lipoproteins (LDL) because it contains all the components of LDL but also oxidized phospholipids and apolipoprotein(a) [apo(a)], a unique protein structurally similar to plasminogen, with atherothrombotic, proinflammatory, and antifibrinolytic properties. Lipoprotein (a) is the single most common genetically-inherited risk factor for coronary heart disease (CHD) and it is also causative of calcific aortic valve stenosis.<sup>1</sup> Lipoprotein (a) levels above 75 nmol/L (30 mg/dL) are considered pro-atherothrombotic and are found in 20% of the population.<sup>2</sup> Here, we report a young patient with severe recurrent episodes of coronary syndromes presenting with very-high circulating Lp(a) levels and the prothrombin rs1799963 (G20210A) genetic variant associated with an increased risk of thromboembolism.<sup>3</sup>

## Timeline

Time	Events
Day 1	Onset of chest pain. Clinical and biological presentation of an acute coronary syndrome with ST-elevation myocardial infarction. Cardiac computed tomography revealed complete occlusion of the right coronary artery (RCA) and suspicion of multi-vessel coronary disease. Coronary angiography was performed followed by recanalizations with drug-eluting stents of (i) the distal RCA, (ii) the left anterior descending artery, (iii) the ramus intermedius artery, and (iv) the circumflex artery.
Day 2	Patient stable, no recurrent angina.
Day 5	Standard lipid biological tests normal.
2 months	Stress echography revealed no coronary insufficiency and no left ventricular dysfunction.
5 months	New acute coronary syndrome. Angiography revealed severe double stenosis of the proximal and distal RCA treated by two drug-eluting stents.
6 months	Detection of very-high levels of plasma lipoprotein (a) and of a rs1799963 (G20210A) polymorphism on the <i>prothrombin</i> gene. Onset of lipoprotein apheresis treatment every fortnight.
12 months	No recurrent chest-pain. Echo stress control normal. Ejection fraction stable at 71%.
24 months	No recurrent chest-pain. Echo stress control normal.
54 months	Myocardial perfusion scintigraphy control normal. Coronary angiography control showed a stable zone of 30% restenosis in the area of RCA stents.

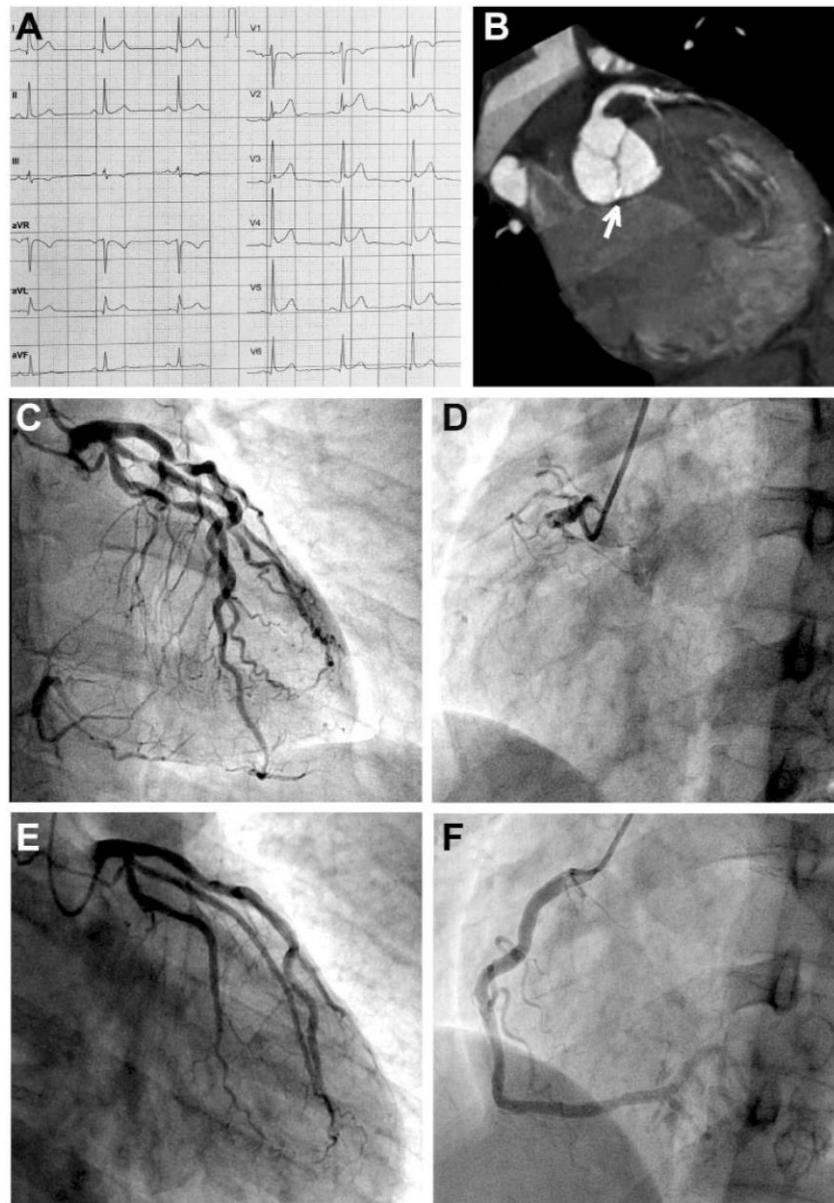
## Case presentation

A 32-year-old Caucasian man presented to our department with acute chest pain. The patient experienced an episode of severe

angina for 50 min. His past medical history included migraines until the age of 16 with symptomatic treatment. The patient was otherwise healthy (non-smoker, exercised daily, no diabetes, and not hypertensive) with a family history of heart disease (maternal grandfather underwent coronary bypass at age 51). Serum troponin level was positive at 0.419 ng/mL (reference range 0.00–0.04 ng/mL), and biological tests showed normal lipids with LDL-cholesterol at 2.9 mmol/L (reference range 2.6–5.7 mmol/L) or 112.1 mg/dL.

Physical examination did not show any sign of cardiac insufficiency. Electrocardiogram demonstrated sinus rhythm at 77/min and ST-segment elevation in leads I, v2, v3, v4 and fragmented QRS in v3, v4 suggestive of high lateral wall myocardial infarction (MI) (Figure 1A). Since the patient was young and otherwise healthy, a cardiac computed tomography (CT) was performed initially. It revealed triple-vessel coronary disease with right coronary artery (RCA) occlusion and severe stenosis at the origin of the left anterior descending artery (LAD) (Figure 1B). Coronary angiogram confirmed myocardial CT findings with total RCA occlusion, 50–70% stenosis of the proximal LAD at its bifurcation to diagonal artery, 70–90% stenosis of the circumflex artery, 70–90% stenosis of the ramus intermedius and marginal arteries (Figure 1C and D). Two-dimensional echo examination showed 70% left ventricular (LV) ejection fraction with no dyskinesia, no LV hypertrophy, no valve pathology, and an absence of pericardial effusion. As coronary artery bypass grafting was not an available option, coronary multi-vessel angioplasty was performed in emergency. Full revascularization by percutaneous coronary intervention has given excellent results<sup>4</sup> and has therefore become our institutional practice in particular for young patients with no overt cardiovascular risk factor and not in cardiogenic shock. Recanalizations with drug eluting stents of the distal RCA (Everolimus, Promus Element Plus, 2.75 × 16 mm, Boston Scientific), proximal LAD (Everolimus, Promus Element Plus, 2.75 × 24 mm, Boston Scientific), ramus intermedius artery (Everolimus, Promus Element Plus, 2.75 × 16 mm, Boston Scientific), and circumflex artery (Zotarolimus, Resolute Integrity, 2.75 × 18 mm, Medtronic) were performed (Figure 1E and F). The patient was stabilized and asymptomatic. He was prescribed lipid-lowering medication (atorvastatin 80 mg), beta-blocker (bisoprolol 2.5 mg), and antiplatelet therapy (aspirin 100 mg + clopidogrel 75 mg). Stress cardiac test performed 2 months later was normal.

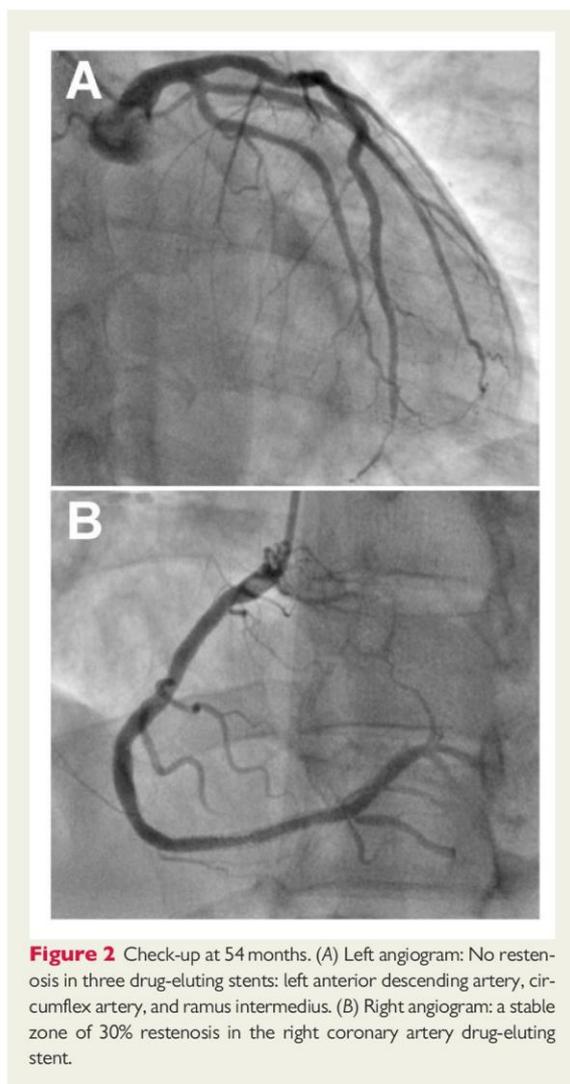
The patient suffered a new angina episode without ST-elevation and serum troponin level at 0.562 ng/mL 5 months later, and coronary angiogram revealed severe double stenosis of the proximal and distal RCA likely resulting from the progression of mild pre-existing lesions. Proximal and distal RCA were treated with two drug-eluting stents (Everolimus, Promus Element Plus, 3.50 × 8 mm and 3.00 × 28 mm, respectively). A series of biological investigations were undertaken showing the absence of anti-DNA, antinuclear, anticardiolipin, anti-beta-2 glycoprotein, and antineutrophil cytoplasmic antibodies. We found the rs1799963 genetic variant on the *prothrombin* gene (G20210A), a polymorphism known to increase the risk of venous thromboembolism. We also found extremely high levels of Lp(a) at 610 nmol/L (reference range <75 nmol/L) or 244 mg/dL despite an otherwise normal lipoprotein profile [total cholesterol 3.49 mmol/L (reference range 3.0–5.2 mmol/L) or 135 mg/dL, triglycerides 0.62 mmol/L (reference range 0.50–1.70 mmol/L) or 55 mg/dL, HDL-cholesterol 1.33 mmol/L (reference range 0.90–1.60 mmol/L) or



**Figure 1** Clinical presentation of a 32-year-old Caucasian man before and after recanalization for an acute coronary syndrome. (A) Baseline admission electrocardiogram showing ST-elevation in leads I and V2, V3, V4. (B) Computed tomography scan. Proximal anterior LAD showing 70% stenosis and calcifications of the aortic valve (arrow) and at the origin of the left anterior descending artery. (C) Proximal anterior LAD showing 50–70% stenosis at its bifurcation to diagonal artery, 70–90% stenosis of the circumflex artery, 70–90% stenosis of the ramus intermedius, and severe stenosis of the marginal artery. (D) Right coronary artery occlusion. (E) Proximal LAD, ramus intermedius artery, and circumflex artery stentings. (F) Right coronary artery stenting.

51 mg/dL, LDL-cholesterol 1.88 mmol/L (reference range 2.6–5.7 mmol/L) or 73 mg/dL, apolipoprotein B100 76 mg/dL (reference range 40–125 mg/dL), and apolipoprotein A-I 138 mg/dL (reference range >120mg/dL)].

The patient medication was changed for atorvastatin 80 mg, anti-platelet therapy (aspirin 75 mg + 2 × 90 mg ticagrelor), and a beta-blocker (bisoprolol 2.5 mg). An arterio-venous fistula was created to allow efficient extracorporeal removal of lipoproteins from blood.



**Figure 2** Check-up at 54 months. (A) Left angiogram: No restenosis in three drug-eluting stents: left anterior descending artery, circumflex artery, and ramus intermedius. (B) Right angiogram: a stable zone of 30% restenosis in the right coronary artery drug-eluting stent.

The patient was treated by double filtration plasmapheresis (DFPP). This procedure was performed using the Plasauto<sup>®</sup> plasmapheresis system with plasma separator Plasmaflo OP-08W and plasma fractionator Cascadeflo EC-50W (Asahi Medical Co., Ltd, Tokyo, Japan). The processed plasma volume was 4L/session. This DFPP was performed every fortnight. His Lp(a) levels are on average  $237 \pm 45$  nmol/L ( $95 \pm 18$  mg/dL) before and drop down to  $63 \pm 10$  nmol/L ( $25 \pm 3$  mg/dL) after each apheresis procedure (reduction rate of 73% per session and 90% vs. baseline) with apolipoprotein B100 levels of  $62 \pm 33$  and  $17 \pm 9$  mg/dL, respectively. Since initiation of apheresis (43 months in total), the patient never experienced any recurrent episode of angina or chest pain. A coronary angiogram performed in January 2018 showed no restenosis in the left coronary arteries (Figure 2A) but a small-stabilized zone of restenosis affecting approximately 30% of the area within the RCA drug-eluting stent (Figure 2B). Scintigraphy showed normal myocardial perfusion in relaxed and stress states (not shown), whereas cardiac magnetic

resonance imaging showed the sequelae of initial MIs in the inferior and apex zones (Supplementary material online, Video S1). Doppler ultrasound imaging indicated that abdominal aorta, extra-cranial arteries, and lower limb arteries are normal.

## Discussion

Besides isolated Lp(a)-hyperlipoproteinaemia, our patient carries the *prothrombin* rs1799963 genetic variant associated with an increased risk of venous thromboembolism as well as with an increased overall risk of MI, an association markedly increased in young individuals and for which antiplatelet therapies seem to be the adequate treatment.<sup>3</sup>

However, MI in healthy and fit young individuals often occurs in patients with familial hypercholesterolaemia (FH), a genetic condition resulting either from the presence of mutations on the *LDL receptor* gene, or occasionally from the presence of mutations on genes coding for *apolipoprotein B100*, *Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9* (PCSK9), or the *LDL receptor adaptor protein*.<sup>5</sup> These mutations systematically impair LDL-cholesterol removal from the blood. Combination of statins, ezetimibe and the recent PCSK9 inhibitors is the gold standard treatment to sharply reduce LDL-cholesterol levels and CHD risk in FH patients.<sup>5</sup> Lipoprotein apheresis is sometimes required to treat the most severe forms of FH, in particular homozygotes.<sup>6</sup>

Unfortunately, neither statins nor ezetimibe reduce Lp(a),<sup>7</sup> whereas PCSK9 inhibitors lower Lp(a) by 20–30%.<sup>1</sup> Lipoprotein apheresis is therefore the only suitable treatment to bring individuals with isolated Lp(a)-hyperlipoproteinaemia such as our patient, as close as possible to the Lp(a) cut-point of 75 nmol/L (30 mg/dL) to substantially reduce their CHD risk. In that respect, a randomized crossover trial of 20 patients with refractory angina and Lp(a) levels above 125 nmol/L (50 mg/dL) recently showed that lipoprotein apheresis improves myocardial perfusion reserve, exercise capacity, angina symptoms, quality of life, and reduces carotid wall volume.<sup>8</sup> Injectable therapies such as antisense oligonucleotides that specifically target hepatic apo(a) messenger RNA, and hence obliterate apo(a) protein synthesis, are currently being developed.<sup>1</sup> As they consistently reduce circulating Lp(a) by 90% in phase II trials, these new drugs will certainly become a robust alternative to the long, invasive, and costly apheresis procedures for patients with extreme Lp(a) levels.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *European Heart Journal - Case Reports* online.

## Funding

This work was funded by the program grant CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) granted by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007) to Gilles Lambert.

**Slide sets:** A fully edited slide set detailing this case and suitable for local presentation is available online as Supplementary data.

**Consent:** The author/s confirm that written consent for submission and publication of this case report including image(s) and associated text has been obtained from the patient in line with COPE guidance.

**Conflict of interest:** none declared.

## References

1. Tsimikas S. A test in context: lipoprotein(a): diagnosis, prognosis, controversies, and emerging therapies. *J Am Coll Cardiol* 2017;**69**:692–711.
2. Burgess S, Ference BA, Staley JR, Freitag DF, Mason AM, Nielsen SF, Willeit P, Young R, Surendran P, Karthikeyan S, Bolton TR, Peters JE, Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Benn M, Langsted A, Schnohr P, Vedel-Krogh S, Kobylecki CJ, Ford I, Packard C, Trompet S, Jukema JW, Sattar N, Di Angelantonio E, Saleheen D, Howson JMM, Nordestgaard BG, Butterworth AS, Danesh J. Association of LPA variants with risk of coronary disease and the implications for lipoprotein(a)-lowering therapies. *JAMA Cardiol* 2018;**3**:619–627.
3. Li C, Ren H, Chen H, Song J, Li S, Lee C, Liu J, Cui Y. Prothrombin G20210A (rs1799963) polymorphism increases myocardial infarction risk in an age-related manner: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2017;**7**:13550.
4. Wald DS, Morris JK, Wald NJ, Chase AJ, Edwards RJ, Hughes LO, Berry C, Oldroyd KG. Randomized trial of preventive angioplasty in myocardial infarction. *N Engl J Med* 2013;**369**:1115–1123.
5. Thedrez A, Blom DJ, Ramin-Mangata S, Blanchard V, Croyal M, Chemello K, Nativel B, Pichelin M, Cariou B, Bourane S, Tang L, Farnier M, Raal FJ, Lambert G. Homozygous familial hypercholesterolemia patients with identical mutations variably express the LDLR (low-density lipoprotein receptor): implications for the efficacy of evolocumab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;**38**:592–598.
6. Raal FJ, Hovingh GK, Blom D, Santos RD, Harada-Shiba M, Bruckert E, Couture P, Soran H, Watts GF, Kurtz C, Honarpour N, Tang L, Kasichayanula S, Wasserman SM, Stein EA. Long-term treatment with evolocumab added to conventional drug therapy, with or without apheresis, in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: an interim subset analysis of the open-label TAUSSIG study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;**5**:280–290.
7. Khera AV, Everett BM, Caulfield MP, Hantash FM, Wohlgemuth J, Ridker PM, Mora S. Lipoprotein(a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *Circulation* 2014;**129**:635–642.
8. Khan TZ, Hsu L-Y, Arai AE, Rhodes S, Pottle A, Wage R, Banya W, Gatehouse PD, Giri S, Collins P, Pennell DJ, Barbir M. Apheresis as novel treatment for refractory angina with raised lipoprotein(a): a randomized controlled cross-over trial. *Eur Heart J* 2017;**38**:1561–1569.

## **Discussion et perspectives**

L'étude de ce patient a permis de démontrer l'efficacité de l'aphèrese dans le traitement de l'hyper-Lp(a). Bien qu'il n'ait plus été sujet à de nouveaux infarctus depuis le début de son traitement, le bénéfice cardiovasculaire lié à la réduction de la Lp(a) n'est pas réellement mesurable. En effet, la mutation de la prothrombine *G20210A* aggrave davantage le profil cardiovasculaire de ce patient, qui en plus de l'aphèrese, est traité avec des antiagrégants plaquettaires pour diminuer le risque de thrombose lié à cette mutation. Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'après aphasère la Lp(a) pouvait, en moyenne, retrouver ses niveaux de bases entre 7 et 14 jours (Ma et al., 2019b; Tselmin et al., 2017), suggérant un traitement quasi hebdomadaire pour atteindre une efficacité maximale. Malheureusement, l'aphèrese est une technique coûteuse, invasive et très contraignante pour les patients. Par exemple, les fistules généralement installées au niveau des avant-bras des patients pour pouvoir réaliser l'aphèrese peuvent facilement s'obstruer et contraindre les patients à une interruption parfois longue de leur traitement, les exposant ainsi davantage à des récives. C'est pourquoi des thérapies comme les siRNA ou les oligonucléotides antisens ciblant spécifiquement l'apo(a) sont nécessaires pour soigner convenablement les patients atteints d'hyper-Lp(a). Leur efficacité pour réduire le risque cardiovasculaire reste à démontrer par des essais cliniques (Tsimikas et al., 2020).

Outre l'aphèrese, les inhibiteurs de PCSK9 représentent le seul traitement actuellement disponible capable de réduire significativement des taux de Lp(a) et le risque cardiovasculaire associé (O'Donoghue et al., 2019). Pourtant, les mécanismes par lesquels les inhibiteurs de PCSK9 diminuent la Lp(a) ne sont toujours pas connus.

## Article 6

# **The size of apolipoprotein (a) is an independent determinant of the reduction in Lipoprotein (a) by PCSK9 inhibitors.**

Blanchard V\*, Hollstein T\*, Chong-Hong-Fong C, Grenkowitz T, Nativel B, Chemello K, Coassin S, Croyal M, Kassner U, Lamina C, Steinhagen-Thiessen E, and Lambert G.

*Soumis dans European Heart Journal (Juin 2020).*

### Résumé

Les statines entraînent une forte réduction des taux de cholestérol total et de LDL cholestérol mais n'abaissent pas les niveaux circulants de Lp(a) (Khera et al., 2014). Dans ces conditions, aucun spécialiste n'avait prédit que les inhibiteurs de PCSK9 qui, comme les statines, augmentent le nombre de LDLR à la surface des hépatocytes, induiraient une réduction moyenne de Lp(a) de 30% en parallèle d'une réduction de 50 à 60% des concentrations plasmatiques de LDL cholestérol (Sabatine et al., 2015; Stein et al., 2012). Cependant une grande variabilité inter-individuelle existe en termes d'efficacité des inhibiteurs de PCSK9 sur la réduction des niveaux de Lp(a). Les mécanismes physiologiques sous-jacents à ces réductions restent à établir. Le rôle du LDLR a d'abord été suggéré, mais il reste aujourd'hui controversé.

Comme *LPA* et *APOE* sont les deux gènes principaux qui expliquent les niveaux plasmatiques de Lp(a), nous avons cherché à établir si la baisse de la Lp(a) induite par les anticorps monoclonaux anti-PCSK9, était variablement modulée en fonction du polymorphisme de l'apoE (apoE2, apoE3, apoE4) ou de l'apo(a) (nombre de répétitions du domaine KIV). Dans cette étude, nous avons étudié la réduction de la Lp(a) induite par les deux anticorps monoclonaux inhibiteurs de PCSK9, l'alirocumab et l'evolocumab, dans une cohorte de 268 patients à haut risque cardiovasculaire en fonction du polymorphisme de leurs apoE et apo(a). Nous avons donc déterminé par LC-HRMS, les phénotypes d'apoE et les niveaux d'apo(a) et d'apoB100 plasmatiques avant et après traitement aux inhibiteurs de PCSK9. En parallèle nous

avons déterminé la taille exacte et l'expression de chaque isoforme d'apo(a) par Western Blot, avant et après traitement.

Nous rapportons ici pour la première fois que la réduction relative des concentrations de Lp(a) induite par les inhibiteurs de PCSK9 est fortement et négativement corrélée à la taille de l'apo(a). En d'autres termes, chaque incrément de taille, équivalent à une répétition supplémentaire du domaine KIV<sub>2</sub> de l'apo(a), est associé à une réduction relative supplémentaire de 3% des niveaux de Lp(a) après traitement. Aucune association significative n'a en revanche été identifiée entre la réduction relative de la Lp(a) et le phénotype de l'apoE. L'absence de corrélation significative entre la diminution des niveaux d'apoB100 liée aux VLDL, aux IDL et aux LDL et la diminution des niveaux de Lp(a) démontre par ailleurs que les mécanismes d'épuration de ces différentes classes de lipoprotéines sont distincts, suggérant un rôle minoritaire voire nul du LDLR dans la clairance hépatique de la Lp(a).

## **The size of apolipoprotein (a) is an independent determinant of the reduction in Lipoprotein (a) by PCSK9 inhibitors.**

### **Authors:**

Valentin Blanchard<sup>1\*</sup>, Tim Hollstein<sup>2\*</sup>, Clément Chong-Hong-Fong<sup>1</sup>, Thomas Grenkowitz<sup>2</sup>, Brice Nativel<sup>1</sup>, Kévin Chemello<sup>1</sup>, Stefan Coassin<sup>3</sup>, Mikaël Croyal<sup>4</sup>, Ursula Kassner<sup>2</sup>, Claudia Lamina<sup>3</sup>, Elisabeth Steinhagen-Thiessen<sup>2</sup>, and Gilles Lambert<sup>1</sup>.

### **Affiliations:**

<sup>1</sup>Université de La Réunion, INSERM UMR 1188 DÉTROU, Sainte-Clotilde, France; <sup>2</sup>Department of Endocrinology, Campus Virchow-Klinikum, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany; <sup>3</sup>Institute of Genetic Epidemiology, Department of Genetics and Pharmacology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria; <sup>4</sup>NUN, INRA, CHU Nantes, UMR 1280, PhAN, IMAD, CRNH-O, Nantes, France.

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

\* equal contributors

**Non-Standard Abbreviations:**

Apo, Apolipoprotein

CVD, Cardiovascular Disease

eGFR, Estimated Glomerular Filtration Rate

HeFH, Heterozygous Familial Hypercholesterolemia

HMW, High Molecular Weight

IDL, Intermediate-Density Lipoprotein

KIV, Kringle IV

LDL, Low-Density Lipoprotein

LDL-C, LDL-Cholesterol

LMW, Low Molecular Weight

Lp(a), Lipoprotein (a)

PCSK9, Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9

PCSK9i, PCSK9 Inhibitor

VLDL, Very Low-Density Lipoprotein

## INTRODUCTION

Elevated lipoprotein (a) [Lp(a)] is the single most common genetically-inherited risk factor for cardiovascular disease (CVD) and calcified aortic valve stenosis <sup>1</sup>. Lp(a) is made of a unique protein, apolipoprotein (a) [apo(a)] bound to the apolipoprotein B100 (apoB100) moiety of a low-density lipoprotein (LDL) like particle <sup>2,3</sup>. Apo(a) is a protein almost exclusively synthesized by the liver <sup>1</sup>. It presents a highly repetitive structure consisting in ten subtypes of the plasminogen-derived kringle IV domain (KIV<sub>1</sub> to KIV<sub>10</sub>), followed by one kringle V and one inactive protease domain. The KIV<sub>2</sub> domain can be present in 1 to more than 40 copies per allele. As a result, at least 40 isoforms of apo(a) exist in humans <sup>2,3</sup>. Apo(a) isoform size is inversely correlated with plasma Lp(a) concentrations. Thus, low molecular weight (LMW) isoforms (<23 KIV; isoform nomenclature always reports the total number of KIV) are associated with markedly higher median Lp(a) levels than high molecular weight (HMW) isoforms (≥23 KIV). Depending on the ethnic background of the study population, apo(a) isoforms explains 30% to 70% of the Lp(a) variance, making them the largest single genetically determined factor regulating Lp(a) <sup>1</sup>.

Large Lp(a)-specific genome wide association studies show that besides the *LPA* gene that encodes apo(a) and accounts for up to 90% of the variation in circulating Lp(a) levels in humans, the *APOE* locus that encodes apolipoprotein E (apoE) is the only other gene identified to have significant association with circulating Lp(a) concentrations <sup>4,5</sup>. ApoE is a 299 amino acid protein predominantly synthesized by the liver <sup>6</sup>. In humans, three common apoE isoforms exist (ε2, ε3 and ε4). They differ by the presence of different amino acids at position 112 and 158: cysteines at both sites for ε2, arginines at both sites for ε4, and respectively cysteine and arginine for ε3 which is considered wild type <sup>7</sup>. ApoE variants have been shown to influence Lp(a) concentrations <sup>8-10</sup>, with ε2/ε2 and ε4/ε4 carriers presenting the lowest and highest Lp(a) plasma levels, respectively.

Statins, that sharply reduce total and LDL cholesterol (LDL-C) levels, do not lower the circulating levels of Lp(a) <sup>11,12</sup>. On these premises, it had not been anticipated that Proprotein Convertase Subtilisin Kexin

Type 9 (PCSK9) inhibitors, which like statins increase the abundance of the LDL receptor at the cell surface, would induce a 25-30% reduction in Lp(a) paralleling a 50-60% reduction in LDL-C plasma concentrations<sup>13</sup>. The physiological mechanisms by which the PCSK9 inhibitors (PCSK9i) Alirocumab and Evolocumab, two fully human monoclonal antibodies targeting circulating PCSK9, reduce Lp(a) remain to be established<sup>14,15</sup>.

Given that *LPA* and *APOE* are the only genes that modulate circulating Lp(a) levels<sup>4</sup>, we aimed to establish whether Lp(a) lowering induced by Alirocumab and Evolocumab was variably affected in carriers of  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  or  $\epsilon 4$  isoforms or by the size of apo(a). We therefore investigated the reduction of Lp(a) induced by Alirocumab or Evolocumab in a cohort of patients at high CVD risk<sup>16</sup> in relation to their apoE and apo(a) polymorphisms. We now report that the relative reduction of Lp(a) induced by PCSK9 inhibitors is highly and negatively correlated with the size of apo(a).

## METHODS

**Patients** - Adult patients receiving a PCSK9i (Alirocumab 75 or 150 mg sc. or Evolocumab 140 mg sc. once every 2 weeks) in line with current medical guidelines were eligible for inclusion into the study and recruited at the Outpatient Lipid Clinic of the Charité Hospital (Berlin, Germany) between 2015 and 2018. All patients were hypercholesterolemic with either a very high CV risk, or heterozygous familial hypercholesterolemia HeFH, and not below LDL-C therapeutic target despite maximally tolerated lipid-lowering therapy. CV risk was defined according to the European Society of Cardiology guidelines<sup>17</sup>. HeFH diagnosis was defined by a Dutch Lipid Clinic Network score above 8 points. Written informed consent was obtained in agreement with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki under protocol EA4/101/17 approved by the institution's ethics committees on research on humans. There were 2 study visits, the first before the start of PCSK9i treatment (where patients also received PCSK9i usage instructions by a physician) and the second 4 weeks after treatment initiation (all patients received 2 injections of a PCSK9i). During these visits, patients underwent blood sampling following an overnight fast. Blood was collected in EDTA tubes for plasma isolation by centrifugation.

Plasma aliquots were stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels were measured using standard colorimetric assays whereas LDL-C levels were determined by beta-quantification in the biochemistry department of Charité Hospital (Berlin, Germany). Demographic and clinical parameters were recorded as detailed previously<sup>16</sup>.

**Apolipoproteins measurements and apoE phenotyping** - Plasma apolipoproteins (a), B100, and E molar concentrations as well as apoE phenotyping based on major isoforms (E2/ E3/ E4) were determined by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Given that there is only one molecule of apo(a) and one molecule of apoB100 on each Lp(a) particle, we calculated the concentration of apoB100 specifically present on the other apoB100 containing lipoproteins [i.e. very low-density lipoproteins (VLDL), intermediate-density lipoproteins (IDL), and LDL] by subtracting the molar concentration of apo(a) to that of apoB100, and converting this molar concentration into mg/dL using a molecular weight of 521,858 Da for apoB100. Plasma samples were prepared using a validated method involving trypsin proteolysis and subsequent analysis of proteotypic peptides described previously<sup>18,19</sup>. LC-HRMS analyses of peptides were carried out on a Dionex Ultimate 3000 UHPLC System (Thermo Fisher Scientific, San Jose CA, USA) interfaced to Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) and performed by targeted parallel reaction monitoring (PRM) assay. Inclusion list for PRM analysis is detailed in *Supplemental Table S1*. Proteotypic peptides were separated over 13.5 min on an Aeris<sup>TM</sup> XB-C<sub>18</sub> column (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, Le Pecq, France) held at  $60^{\circ}\text{C}$  with a linear gradient of mobile phase B (100% acetonitrile) in mobile phase A (5% acetonitrile) each containing 0.1% formic acid at a flow rate of 350  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Optimized LC-HRMS parameters are detailed in *Supplemental Table S2*. Data were collected in positive heated electrospray ionization (HESI) mode. Instrument control and data acquisition were performed using the Xcalibur software (Version 4.3, Thermo Fisher Scientific). Quantitation and detection of proteotypic peptides were performed using the Skyline software version 19.1 (MacCoss Laboratory, Seattle WA, USA). ApoE phenotyping and average apo(a) size were determined using a validated protocol described previously<sup>18,19</sup>.

**Determination of apo(a) isoforms sizes on agarose gel electrophoresis** - Based on the apo(a) concentrations determined by LC-HRMS at inclusion visit, plasma samples from each patient were diluted in deionized water at apo(a) concentration of 1.33 pmol/ $\mu$ L and subsequently mixed with 4X loading buffer (100mM Tris, 2 mM EDTA, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue). Molecular weight standards were prepared similarly from a mix of 5 plasma from individuals carrying genetically validated apo(a) isoform sizes. Samples and standards preparations were heated for 5 minutes at 95 °C and 10 $\mu$ L were loaded onto 3% agarose-TBE gels. Electrophoresis was run in TBE buffer containing 0.1% EDTA for 5h at 65 mA. Proteins were subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane in Tris-glycine buffer containing 0.1% SDS and 10% methanol. Membranes were blocked for 1 hour in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween and 5% fat-free milk powder. Membranes were then incubated for 1 hour with the TA310972 anti-apo(a) rabbit monoclonal antibody that specifically targets human apo(a) kringle (Origen, Rockville MD, USA) diluted 1/20000 in blocking buffer. Membranes were washed three times in PBS containing 0.05% Tween and subsequently incubated for 1hr with a Horseradish Peroxidase conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) diluted 1/10000 in PBS containing 0.05% Tween and 5% BSA. Membranes were washed as above and bands were visualized by chemiluminescence using SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific) on the Amersham Imager 680 and imaging software (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France).

**Statistical analyses** - Statistical analyses were performed using Prism version 6.01 and R version 3.6.1. Categorical parameters are presented using frequencies (percentages) and were compared using the Fisher exact test. Continuous parameters are presented as mean  $\pm$  SD and were compared using paired or unpaired student t tests. Continuous parameters not normally distributed are presented as median (25<sup>th</sup> – 75<sup>th</sup> percentiles) and were compared using Mann-Whitney or Wilcoxon signed rank tests. For multiple comparisons of quantitative variables with normal and non-normal distributions we used one-way ANOVA and Kruskal-Wallis tests, respectively. Spearman correlation coefficients were determined to assess the correlation between quantitative variables. To assess the impact of apo(a)

isoforms on Lp(a) decrease, two approaches were applied: (i) apo(a) isoforms were correlated on percentage changes of Lp(a) and (ii) regression models were used with Lp(a) values after treatment as outcome, adjusting for baseline values. To account for skewed distribution, Lp(a) was log-transformed. Therefore, beta estimates from these models can be interpreted as percentage changes. These regression models were further adjusted for other potential confounders. A p value below 0.05 was considered statistically significant throughout.

## RESULTS

**Patients characteristics at inclusion** - We recruited 268 consecutive patients at high CVD risk, including 57.5% men and 42.5% women. On average they were 62±11 years old with BMI of 27.8±4.7 kg/m<sup>2</sup>. 17,9 % were smokers, 22.8% were diabetic, 58.2% had hypertension, and 80.6% had suffered a cardiovascular event. Their clinical and biochemical characteristics at inclusion are recorded in **Table 1**. Only 31.3% of these patients were on high intensity lipid lowering treatment (i.e. 40-80 mg Atorvastatin or 20-40 mg Rosuvastatin with or without 10mg Ezetimibe daily), 19.4% were on lower doses of statins and 49.3% were intolerant to statins. None of these patients reached the recommended therapeutic target (i.e. LDL-C below 70 mg/dL). They presented on average elevated total and LDL cholesterol levels, at 237±71 and 160±62 mg/dL, respectively. Apolipoproteins plasma concentrations were measured by LC-HRMS. Apo(a)/Lp(a) plasma distribution was skewed with a median (interquartile range) of 50 (15-122) nmol/L. The smaller isoform of apo(a) had a median (interquartile range) number of 24 (21-31) KIV domains (**Table 1**). ApoE plasma levels were found at 9.8±6.8 mg/dL. Consistent with elevated total and LDL cholesterol levels, apoB100 was high, on average at 128±39 mg/dL. The concentration of apoB100 specifically present on VLDL, IDL and LDL [i.e. not on Lp(a)] was also high at 121±42 mg/dL. All patients were prescribed a PCSK9i as follows: 126 received Evolocumab 140mg, 89 Alirocumab 150 mg, and 53 Alirocumab 75mg, every 2 weeks. We verified that the demographic, clinical and biochemical characteristics of the patients were consistent in each treatment group. Only one parameter was different. Significantly fewer patients who were prescribed

Alirocumab 150mg were hypertensive compared with those prescribed Alirocumab 75 mg or Evolocumab 140 mg (**Table 1**). Given that blood pressure impacts on renal function and that impaired renal function modulates circulating Lp(a) levels<sup>1</sup>, we verified the absence of significant difference in glomerular filtration rate between our treatment groups [73(58-82) vs. 76(68-82) vs. 75(63-83), respectively]. Another difference among these groups was that patients who were prescribed the 75mg dose of Alirocumab had on average significantly lower baseline LDL-C than those prescribed 140mg Evolocumab or 150mg Alirocumab ( $138\pm 56$  vs.  $162\pm 66$  and  $169\pm 57$  mg/dL, respectively).

**Changes in plasma lipids and lipoproteins following PCSK9i treatment** - We next assessed the changes in plasma lipids and lipoproteins of each patient between inclusion and one month after initiation of PCSK9i treatments. As anticipated, PCSK9i sharply reduced plasma TC by  $38\pm 14\%$ , LDL-C by  $57\pm 18\%$ , apoB100 by  $47\pm 17\%$ , and apoE by  $39\pm 25\%$ . Substantial reductions in apo(a)/Lp(a) plasma levels were also observed ( $-36\pm 35\%$ ). Limited reductions were seen for TG and apoCIII ( $-15\pm 33$  and  $-23\pm 51\%$ , respectively), whereas HDL-C slightly increased by  $11\pm 20\%$  (**Table 2**). Of note, patients treated with the lower dose of Alirocumab (75mg) had significantly smaller decreases in TC, LDL-C, apoB100 and apo(a)/Lp(a) than patients treated with either Alirocumab 150mg or Evolocumab 140mg (**Table 2**). There was no significant difference in efficacy between Alirocumab 150 mg and Evolocumab 140 mg treatments for any of the measured parameters.

To further explore the efficacy of PCSK9i treatments in our patients, we plotted their individual changes in apoB100 specifically present on VLDL/IDL/LDL and in apo(a) plasma levels after one month of treatment (**Figure 1**). Three of our 268 patients did not respond to PCSK9i in terms of apoB100 lowering. Noteworthy, PCSK9i also failed to lower LDL-C in these patients (from -14 to + 46 mg/dL). Two of these patients were treated with Alirocumab 75mg and one with Evolocumab 140mg. One was on high intensity lipid lowering treatment, one on low dose statin and one was statin intolerant. Likewise, 37 of our 268 patients did not respond to PCSK9i in terms of Lp(a) lowering (**Figure 1**). For 17 of them, apo(a) was virtually absent from their plasma at baseline, i.e. below the LC-HRMS detection threshold, which was confirmed by agarose gel electrophoresis (see below). The 20 remaining non-responders were found in each treatment group, and included a slightly lower proportion of statin treated patients

than the entire cohort (40 vs. 50.7%). Interestingly, we did not see any significant correlation between the absolute changes in apoB100 on VLDL/IDL/LDL and the absolute changes in apo(a)/Lp(a) plasma levels following PCSK9i treatment in the entire cohort ( $r=-0.078$ ,  $p=0.201$ ), and also when correlating percent changes in apoB100 and in apo(a) ( $r=0.0911$ ,  $p=0.137$ ).

**Impact of apo(a) isoforms on Lp(a) reductions** - To determine whether apo(a) polymorphism impacts on the response to PCSK9i in terms of Lp(a) lowering, we next measured by Western blot the expression of each apo(a) isoform in equal volumes of plasma collected from 268 patients before and after a month of treatment with Alirocumab or Evolocumab. Two apo(a) isoforms of different sizes were detected in 122 patients, one single detectable isoform was found in 129 patients, and 17 patients had no detectable apo(a) by Western blot. The relative intensity of each apo(a) isoforms was assessed by densitometric analysis and the percent change from baseline was calculated and plotted against their respective number of KIV (**Figure 2**). We found a positive correlation between the size of apo(a) and the percent reduction in apo(a)/Lp(a) induced by PCSK9i treatments. This observation was significant in the group of 129 patients with a single detectable apo(a) isoform ( $r=0.309$ ,  $p=0.0003$ ), as well as in the group of 122 patients with two detectable apo(a) isoforms ( $r=0.422$ ,  $p=0.0001$ ). In this group, we also found a positive correlation between the size of apo(a) isoforms and their relative reduction following PCSK9i treatment separately for the smaller ( $r=0.350$ ,  $p=0.0001$ ) and larger ( $r=0.324$ ,  $p=0.0003$ ) isoforms (**Figure 2**). For each of these 122 patients, we also systematically assessed the relative contribution of the larger and of the smaller apo(a) isoform before and after treatment with PCSK9i to the total levels of apo(a)/Lp(a) measured in the plasma. At baseline, the relative contribution of the larger isoform to apo(a)/Lp(a) circulating levels was 29% (8-52). After one month of treatment this contribution was reduced down to 15% (4-43) ( $p<0.0001$  vs. baseline) (**Figure 3**), indicating that PCSK9i are significantly more effective at reducing the levels of Lp(a) particles carrying large apo(a) isoforms.

Given that Lp(a) plasma concentrations after one month of treatment were highly correlated with Lp(a) plasma concentrations measured at baseline ( $r=0.936$ ,  $p=0.0001$ ) and given that plasma Lp(a) concentrations were inversely correlated with the size of apo(a) isoforms ( $r=-0.679$ ,  $p<0.0001$ ) (**Supplemental Figure 1**), we verified whether the association observed between the size of apo(a) and

the PCSK9i induced reduction in apo(a)/Lp(a) was still significant after adjustment for baseline Lp(a) values. Using the number of KIV determined by western blot as the explaining variable (the smaller of both for patients who displayed two isoforms), the log transformed apo(a)/Lp(a) value at follow-up visit as outcome, and adjusting for log transformed Lp(a) value at baseline, we obtained a  $\beta$  coefficient of 0.0265 ( $p=0.0003$ ), indicating that each additional KIV on apo(a) is associated with an additional 2.65% reduction in Lp(a). Next, we also adjusted for age and sex, and for other potential confounders such as apoE plasma levels and patients renal function [i.e. estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR)]. These adjustments did not substantially alter the strength of the association between apo(a) size and Lp(a) reductions induced by PCSK9i treatments (**Table 3**). Likewise, there was no interaction of PCSK9i treatments (Evolocumab 140mg / Alirocumab 150mg / Alirocumab 75mg) on the effect of the number of KIV on Lp(a) reductions ( $p$  for interaction 0.625). In contrast, we found that PCSK9i promote a higher decrease in apo(a)/Lp(a) in the group of 136 patients treated with statins compared with the group of 132 statin intolerant patients ( $p=0.01$ ). This effect was found highly significant in the group of 52 patients on low or moderate doses of statins ( $p=0.005$ ) but not significant in the group of 84 patients on high intensity lipid lowering treatment ( $p=0.88$ ). Adjustment for lipid lowering treatment did not however change the strength of the association between apo(a) size and Lp(a) reductions induced by PCSK9i (**Table 3**). All together, these analyses indicate that for any given baseline Lp(a) plasma concentration, each increase in apo(a) isoform by one KIV domain is associated with a ~3% additional reduction in Lp(a) levels following PCSK9i treatment. To illustrate this association, **Figure 4** shows predicted Lp(a) levels after treatment for three different examples of Lp(a) concentrations at baseline (25%, 50% and 75% percentile) for patients with varying numbers of KIV domains in apo(a). Thus, according to this model, a patient treated with Evolocumab or Alirocumab starting with 222 nmol/L Lp(a) will end up at 155 nmol/L for 18 repeats in KIV domains in apo(a), but at 135 nmol/L for 23 repeats. Likewise, Lp(a) will be reduced from 50 nmol/L to 36 nmol/L with 20 KIV repeats and to 27 nmol/L with 31 KIV repeats (**Figure 4**).

**Impact of apoE isoforms on Lp(a) reductions** We next investigated the potential effects of *APOE* genotypes on apo(a)/Lp(a) reductions induced by PCSK9i. Carriers of apoE2 isoforms (i.e. E2/E2 and E2/E3) showed a higher percent reduction in Lp(a) than E3/E3 carriers (**Figure 5A**). In agreement with previous studies conducted in larger cohorts<sup>8-10</sup>, we observed a trend for lower baseline circulating Lp(a) levels in apoE2 carriers (n=19) compared with the control group of apoE3 homozygotes (n=162) (**Figure 5B**). After adjustment for baseline Lp(a) plasma levels, the relative reduction in Lp(a) induced by PCSK9i was similar irrespectively of *APOE* genotypes. There was no interaction of any of the *APOE* genotypes (p for interaction 0.702) on the strength of the association between apo(a) size and PCSK9i mediated reductions in Lp(a) (**Table 3**).

## DISCUSSION

In the present study, we assessed the role of apo(a) size and of apoE polymorphism on the extent of Lp(a) reduction induced by PCSK9 inhibitors. As expected, PCSK9 inhibitors sharply reduced circulating apoB100 containing lipoproteins as well as all their major apolipoproteins components. The reduction in apoB100 on VLDL/IDL/LDL did not correlate with the reduction in apo(a), the signature protein of Lp(a). We also found that carriers of the apoE2 isoform responded better to PCSK9i in terms of Lp(a) lowering, an effect driven by their reduced baseline Lp(a) levels. In sharp contrast, we established that the size of apo(a) was a strong determinant of Lp(a) lowering induced by PCSK9i, independently of baseline Lp(a) concentrations and other potential confounders. We conclude that the length of apo(a) is strongly impacting the response of patients to PCSK9i.

Clinical trials have firmly established that Alirocumab and Evolocumab in monotherapy or combined with statins with or without ezetimibe reduce circulating LDL-C levels by 50-60% and Lp(a) by 20-30%, and thereby lower the incidence of cardiovascular events<sup>20,21</sup>. Similar reductions were observed in our “real-world” study<sup>16</sup>. Noteworthy, the baseline Lp(a) concentrations in our patients were generally higher than what is normally observed in the German population, likely due to the selection of patients at high CVD risk<sup>4</sup>. We did not observe any significant correlation between the reduction in apo(a) and the reduction in apoB100 on VLDL/IDL/LDL after four weeks of PCSK9i treatment. Previous studies have shown weak but significant correlations between changes in LDL-C and changes in Lp(a) induced PCSK9i<sup>22</sup>. The most robust demonstration for a positive correlation between these parameters was an analysis of 10 clinical trials with Evolocumab showing a Spearman correlation coefficient of 0.49 between changes in Lp(a) and changes in LDL-C levels after 12 weeks of treatment<sup>23</sup>. Similar results were reported for Alirocumab<sup>24</sup>. A large discordance in response to PCSK9i in terms of LDL-C and Lp(a) lowering was however noticed<sup>25,26</sup>. A potential explanation for the total absence of correlation observed in our study beyond a smaller number of patients investigated and a shorter treatment period, is that we correlated the changes in apo(a) and in apoB100 specifically present on VLDL/IDL/LDL, which both represent the number of lipoprotein particles. The other studies in contrast have correlated the changes in plasma lipids (LDL-C) and in Lp(a) concentrations assessed using

immunological assays. Nevertheless, weak or non-significant correlations between these parameters fuel the hypothesis that PCSK9 (and hence PCSK9 inhibitors) modulates LDL and Lp(a) metabolism via distinct molecular pathways.

Interestingly, in the present study carriers of the apoE2 isoform displayed a higher percent reduction in Lp(a) compared with apoE3 homozygotes. This did not however remain significant after correction for baseline Lp(a) levels, indicating that this apparent effect stems from the fact that apoE2 carriers have naturally reduced Lp(a) levels<sup>8-10</sup>. Although our study is the first to specifically explore the response to PCSK9i in terms of Lp(a) lowering in function of apoE isoforms, the absence of independent effect of apoE2 on the extent of Lp(a) lowering needs to be taken cautiously, given the small number of apoE2 carriers investigated.

In sharp contrast, we observed a highly significant effect of apo(a) isoforms on the response to PCSK9i in terms of Lp(a) lowering, even after correction for baseline Lp(a) concentrations and other potential confounders such as age, sex, hypertension, eGFR, apoE levels/isoforms, and background lipid lowering treatment. These results are in agreement with a recent epidemiological study showing that compared with controls, carriers of loss of function variants on PCSK9 have Lp(a) levels reduced by 18 nmol/L even after correction for age, sex, eGFR, LDL-C and statin use<sup>27,28</sup>. Discrepant with our findings, a study conducted in 115 patients treated with Alirocumab for 8 weeks did not show any different effect of PCSK9i on the percent changes in Lp(a) between carriers of LMW and HMW apo(a) isoforms. However, in the subset of 78 patients with two detectable apo(a) isoforms, a preferential relative reduction in the larger isoform was noticed for 35% of patients, whereas only 3% had a preferential reduction in the smaller isoform<sup>29</sup>, an observation fully in line with our results. To our knowledge, the impact of apo(a) isoforms on Lp(a) lowering has only been evaluated in one study which specifically focussed on Lp(a) reduction in the HPS2-THRIVE randomized trial investigating niacin versus placebo on background simvastatin therapy<sup>30</sup>. Similar to our observations with PCSK9 inhibitors, the bigger the size of the predominant apo(a) isoform, the larger the relative reduction in Lp(a) induced by niacin, even after correction for baseline plasma Lp(a) levels. It therefore appears that the size of apo(a) is a strong parameter influencing the pharmacological reduction in Lp(a), as it is strong determinant of Lp(a)

synthesis/secretion, since large isoforms take more time to mature or exit the endoplasmic reticulum<sup>31–33</sup>. It is thus tempting to speculate that niacin and PCSK9 directly or indirectly modulate either *LPA* gene expression or the synthesis of apo(a) or the assembly of Lp(a). This would require an isoform-effect on the interaction between free apo(a) and apoB100 present on LDL particles, as proposed by others<sup>34</sup>.

Finally, we have established a regression model showing that for any given baseline Lp(a) concentration, the levels of Lp(a) following treatment with PCSK9i (*outcome variable*) decreases with the number of KIV domains present on apo(a) (**Figure4**). In statistics, there is a long-lasting controversy, if “change” analyses should be analysed with change scores or with follow-up data as outcome, adjusting for baseline<sup>35</sup>. Reassuringly, a similar association was observed when correlating apo(a) isoforms with change scores [i.e. (Lp(a)follow-up - Lp(a)baseline)/ Lp(a)baseline], taking it as an outcome variable in regression models, or when including an interaction term between baseline Lp(a) values and the number of KIV repeats (not shown). Our study therefore demonstrates an independent size effect of apo(a) on the response to PCSK9i in terms of Lp(a) lowering. The clinical relevance of this finding remains to be established because: (i) Assessing apo(a) size polymorphism for medical decision is not feasible outside very few specialized research laboratories. (ii) PCSK9i reduce CVD risk primarily as they reduce LDL-C and to a much lower extent as they concomitantly lower Lp(a), this second parameter being clinically relevant only for individuals with elevated baseline Lp(a) levels<sup>36</sup>. (iii) The Lp(a) lowering potential of a drug to be clinically effective has been estimated to be at least 105 nmol/L<sup>37–39</sup>, a threshold reached by less than 15% of our patients. But extremely effective and specific Lp(a) lowering agents in the form of antisense oligonucleotides and siRNAs are underway. It will be quite interesting to evaluate whether patients with longer apo(a) isoforms respond better to such treatments, in particular if these agents target the regions encoding the repeated KIV domains of apo(a). Given that novel PCSK9i in the form of antisense oligonucleotides and siRNAs are also underway<sup>40</sup>, our study paves the way for future investigations to evaluate the intracellular and extracellular mechanisms by which PCSK9 (and hence PCSK9i) modulate Lp(a) levels.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

VB and KC are recipient of a scholarship from the Région Réunion and the European Union (European Regional Development Fund INTERREG V). This work was supported by the French National Project CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007).

1. Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *Journal of Internal Medicine* 2013;**273**:6–30.
2. Tsimikas S, Fazio S, Ferdinand KC, Ginsberg HN, Koschinsky ML, Marcovina SM, Moriarty PM, Rader DJ, Remaley AT, Reyes-Soffer G, Santos RD, Thanassoulis G, Witztum JL, Danthi S, Olive M, Liu L. NHLBI Working Group Recommendations to Reduce Lipoprotein(a)-Mediated Risk of Cardiovascular Disease and Aortic Stenosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2018;**71**:177–192.
3. Boffa MB, Koschinsky ML. Oxidized phospholipids as a unifying theory for lipoprotein(a) and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology* 2019;**16**:305–318.
4. Mack S, Coassin S, Rueedi R, Yousri NA, Seppälä I, Gieger C, Schönherr S, Forer L, Erhart G, Marques-Vidal P, Ried JS, Waeber G, Bergmann S, Dähnhardt D, Stöckl A, Raitakari OT, Kähönen M, Peters A, Meitinger T, Strauch K, Kedenko L, Paulweber B, Lehtimäki T, Hunt SC, Vollenweider P, Lamina C, Kronenberg F. A genome-wide association meta-analysis on lipoprotein (a) concentrations adjusted for apolipoprotein (a) isoforms. *J Lipid Res* 2017;**58**:1834–1844.
5. McCormick SPA, Schneider WJ. Lipoprotein(a) catabolism: a case of multiple receptors. *Pathology* 2019;**51**:155–164.
6. Mahley RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J Mol Med (Berl)* 2016;**94**:739–746.
7. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* 2019;**51**:165–176.
8. Moriarty Patrick M., Varvel Stephen A., Gordts Philip L.S.M., McConnell Joseph P., Tsimikas Sotirios. Lipoprotein(a) Mass Levels Increase Significantly According to APOE Genotype. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* American Heart Association; 2017;**37**:580–588.
9. Kritharides L, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Kamstrup PR, Afzal S. Effect of APOE ε Genotype on Lipoprotein(a) and the Associated Risk of Myocardial Infarction and Aortic Valve Stenosis. *J Clin Endocrinol Metab* Oxford Academic; 2017;**102**:3390–3399.
10. Blanchard V, Croyal M, Khantaline I, Ramin-Mangata S, Chemello K, Nativel B, Blom DirkJ, Marais AD, Lambert G. Reduced Lipoprotein(a) Associated With the Apolipoprotein E2 Genotype Confers Cardiovascular Protection in Familial Hypercholesterolemia. *JACC Basic Transl Sci* 2019;**4**:425–427.
11. Khera AV, Everett BM, Caulfield MP, Hantash FM, Wohlgemuth J, Ridker PM, Mora S. Lipoprotein(a) Concentrations, Rosuvastatin Therapy, and Residual Vascular Risk: An Analysis from the JUPITER Trial. *Circulation* 2014;**129**:635–642.
12. Tsimikas S, Gordts PLSM, Nora C, Yeang C, Witztum JL. Statin therapy increases lipoprotein(a) levels. *Eur Heart J* 2019;
13. Lambert G, Thedrez A, Croyal M, Ramin-Mangata S, Couret D, Diotel N, Nobécourt-Dupuy E, Krempf M, LeBail JC, Poirier B, Blankenstein J, Villard EF, Guillot E. The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies. *Clin Sci (Lond)* 2017;**131**:261–268.
14. Romagnuolo R, Scipione CA, Marcovina SM, Gemin M, Seidah NG, Boffa MB, Koschinsky ML. Roles of the low density lipoprotein receptor and related receptors in inhibition of lipoprotein(a) internalization by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *PLoS One* 2017;**12**.
15. Villard EF, Thedrez A, Blankenstein J, Croyal M, Tran T-T-T, Poirier B, Le Bail J-C, Illiano S, Nobécourt E, Krempf M, Blom DJ, Marais AD, Janiak P, Muslin AJ, Guillot E, Lambert G. PCSK9

Modulates the Secretion But Not the Cellular Uptake of Lipoprotein(a) Ex Vivo: An Effect Blunted by Alirocumab. *JACC: Basic to Translational Science* 2016;**1**:419–427.

16. Hollstein T, Vogt A, Grenkowitz T, Stojakovic T, März W, Laufs U, Böllükbası B, Steinhagen-Thiessen E, Scharnagl H, Kassner U. Treatment with PCSK9 inhibitors reduces atherogenic VLDL remnants in a real-world study. *Vascular Pharmacology* 2019;**116**:8–15.
17. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney M-T, Corrà U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Løchen M-L, Löllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, Worp HB van der, Dis I van, Verschuren WMM. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 2016;**37**:2315–2381.
18. Croyal M, Ouguerram K, Passard M, Ferchaud-Roucher V, Chétiveaux M, Billon-Crossouard S, Gouville A-C de, Lambert G, Krempf M, Nobécourt E. Effects of Extended-Release Nicotinic Acid on Apolipoprotein (a) Kinetics in Hypertriglyceridemic Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;**35**:2042–2047.
19. Blanchard V, Ramin-Mangata S, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Durand M, Chemello K, Nativel B, Flet L, Chétiveaux M, Jacobi D, Bard J-M, Ouguerram K, Lambert G, Krempf M, Croyal M. Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study. *J Lipid Res American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2018;**59**:892–900.
20. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, Kuder JF, Wang H, Liu T, Wasserman SM, Sever PS, Pedersen TR. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* Massachusetts Medical Society; 2017;**376**:1713–1722.
21. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, Edelberg JM, Goodman SG, Hanotin C, Harrington RA, Jukema JW, Lecorps G, Mahaffey KW, Moryusef A, Pordy R, Quintero K, Roe MT, Sasiela WJ, Tamby J-F, Tricoci P, White HD, Zeiher AM. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *New England Journal of Medicine* Massachusetts Medical Society; 2018;**379**:2097–2107.
22. Stoekenbroek RM, Lambert G, Cariou B, Hovingh GK. Inhibiting PCSK9 — biology beyond LDL control. *Nature Reviews Endocrinology* Nature Publishing Group; 2019;**15**:52–62.
23. Raal FJ, Giugliano RP, Sabatine MS, Koren MJ, Blom D, Seidah NG, Honarpour N, Lira A, Xue A, Chiruvolu P, Jackson S, Di M, Peach M, Somaratne R, Wasserman SM, Scott R, Stein EA. PCSK9 inhibition-mediated reduction in Lp(a) with evolocumab: an analysis of 10 clinical trials and the LDL receptor's role. *J Lipid Res* 2016;**57**:1086–1096.
24. Mahmood T, Minnier J, Ito MK, Li QH, Koren A, Kam IW, Fazio S, Shapiro MD. Discordant responses of plasma low-density lipoprotein cholesterol and lipoprotein(a) to alirocumab: A pooled analysis from 10 ODYSSEY Phase 3 studies. *Eur J Prev Cardiol* SAGE Publications Ltd STM; 2020;2047487320915803.
25. Edmiston JB, Brooks N, Tavori H, Minnier J, Duell B, Purnell JQ, Kaufman T, Wojcik C, Voros S, Fazio S, Shapiro MD. Discordant response of low-density lipoprotein cholesterol and lipoprotein(a) levels to monoclonal antibodies targeting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *Journal of Clinical Lipidology* 2017;**11**:667–673.
26. Shapiro MD, Minnier J, Tavori H, Kassahun H, Flower A, Somaratne R, Fazio S. Relationship Between Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Lipoprotein(a) Lowering in Response to PCSK9 Inhibition With Evolocumab. *J Am Heart Assoc* 2019;**8**.

27. Mefford MT, Marcovina SM, Bittner V, Cushman M, Brown TM, Farkouh ME, Tsimikas S, Monda KL, López JAG, Muntner P, Rosenson RS. PCSK9 loss-of-function variants and Lp(a) phenotypes among black US adults. *J Lipid Res* 2019;**60**:1946–1952.
28. Langsted A, Nordestgaard BG, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Kamstrup PR. PCSK9 R46L Loss-of-Function Mutation Reduces Lipoprotein(a), LDL Cholesterol, and Risk of Aortic Valve Stenosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:3281–3287.
29. Enkhmaa B, Anuurad E, Zhang W, Yue K, Li C-S, Berglund L. The roles of apo(a) size, phenotype, and dominance pattern in PCSK9-inhibition-induced reduction in Lp(a) with alirocumab. *J Lipid Res* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2017;**58**:2008–2016.
30. Parish S, Hopewell JC, Hill MR, Marcovina S, Valdes-Marquez E, Haynes R, Offer A, Pedersen TR, Baigent C, Collins R, Landray M, Armitage J. Impact of Apolipoprotein(a) Isoform Size on Lipoprotein(a) Lowering in the HPS2-THRIVE Study. *Circ Cardiovasc Genet* 2018;**11**:e001696.
31. White AL, Guerra B, Lanford RE. Influence of allelic variation on apolipoprotein(a) folding in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1997;**272**:5048–5055.
32. Lobentanz EM, Krasznai K, Gruber A, Brunner C, Müller HJ, Sattler J, Kraft HG, Utermann G, Dieplinger H. Intracellular metabolism of human apolipoprotein(a) in stably transfected Hep G2 cells. *Biochemistry* 1998;**37**:5417–5425.
33. Brunner C, Lobentanz EM, Pethö-Schramm A, Ernst A, Kang C, Dieplinger H, Müller HJ, Utermann G. The number of identical kringle IV repeats in apolipoprotein(a) affects its processing and secretion by HepG2 cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:32403–32410.
34. Becker L, Cook PM, Koschinsky ML. Identification of sequences in apolipoprotein(a) that maintain its closed conformation: a novel role for apo(a) isoform size in determining the efficiency of covalent Lp(a) formation. *Biochemistry* 2004;**43**:9978–9988.
35. Senn S. Change from baseline and analysis of covariance revisited. *Stat Med* 2006;**25**:4334–4344.
36. O'Donoghue ML, Fazio S, Giugliano RP, Stroes ESG, Kanevsky E, Gouni-Berthold I, Im K, Lira Pineda A, Wasserman SM, Češka R, Ezhov MV, Jukema JW, Jensen HK, Tokgözoğlu SL, Mach F, Huber K, Sever PS, Keech AC, Pedersen TR, Sabatine MS. Lipoprotein(a), PCSK9 Inhibition, and Cardiovascular Risk. *Circulation* 2019;**139**:1483–1492.
37. Madsen CM, Kamstrup PR, Langsted A, Varbo A, Nordestgaard BG. Lipoprotein(a)-Lowering by 50 mg/dL (105 nmol/L) May Be Needed to Reduce Cardiovascular Disease 20% in Secondary Prevention: A Population-Based Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;**40**:255–266.
38. Lamina C, Kronenberg F. Estimation of the Required Lipoprotein(a)-Lowering Therapeutic Effect Size for Reduction in Coronary Heart Disease Outcomes: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Cardiol* 2019;**4**:575–579.
39. Burgess S, Ference BA, Staley JR, Freitag DF, Mason AM, Nielsen SF, Willeit P, Young R, Surendran P, Karthikeyan S, Bolton TR, Peters JE, Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Benn M, Langsted A, Schnohr P, Vedel-Krogh S, Kobylecki CJ, Ford I, Packard C, Trompet S, Jukema JW, Sattar N, Angelantonio ED, Saleheen D, Howson JMM, Nordestgaard BG, Butterworth AS, Danesh J. Association of LPA Variants With Risk of Coronary Disease and the Implications for Lipoprotein(a)-Lowering Therapies: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Cardiol* American Medical Association; 2018;**3**:619–627.
40. Ray KK, Corral P, Morales E, Nicholls SJ. Pharmacological lipid-modification therapies for prevention of ischaemic heart disease: current and future options. *The Lancet* 2019;**394**:697–708.

**Table 1: Baseline characteristics of the Study Population**

Baseline characteristics	Entire cohort	Treatment groups		
		Evolocumab 140 mg	Alirocumab 150 mg	Alirocumab 75 mg
N	<b>268</b>	126	89	53
Age (years)	<b>62±11</b>	63±11	62 ±11	63±10
Male sex	<b>57.5 (154)</b>	55.6 (70)	60.7 (54)	56.6 (30)
Body mass index (kg.m <sup>-2</sup> )	<b>27.8±4.7</b>	28.2±4.0	27.3±4.9	28.2±5.5
Current smoker	<b>17.9 (48)</b>	15.1 (19)	19.1 (17)	22.6 (12)
Diabetes mellitus	<b>22.8 (61)</b>	19.8 (25)	23.6 (21)	28.3 (15)
Hypertension	<b>58.2 (156)</b>	66.7 (84)	<b>48.3 (43)**</b>	54.7 (29)
Glomerular filtration rate (mL/min)	<b>74 (63-83)</b>	75 (63-83)	73 (58-82)	76 (68-82)
LLT treatment	<b>50.7 (136)</b>	52.4 (66)	46.1 (41)	54.7 (29)
- High intensity LLT	<b>31.3 (84)</b>	32.5 (41)	25.8 (23)	37.7 (20)
Cardiovascular events	<b>80.6 (216)</b>	77.8 (98)	82.0 (73)	84.9 (45)
Total cholesterol (mg/dL)	<b>237±71</b>	242±77	243±62	215±68
HDL-cholesterol (mg/dL)	<b>52±17</b>	53±16	52±17	50±18
LDL-cholesterol (mg/dL)	<b>160±62</b>	162±66	169±57	<b>138±56*</b>
Triglycerides (mg/dL)	<b>173±129</b>	177±141	158±86	190±157
Apo(a) (nmol/L)	<b>50 (15-222)</b>	76 (17-229)	37 (12-177)	53 (16-242)
Apo(a) size (KIV number)	<b>24 (21-31)</b>	24 (21-30)	25 (22-32)	24 (22-31)
Total apoB100 (mg/dL)	<b>128±39</b>	130±43	132±36	120±36
Non Lp(a)-apoB100 (mg/dL)	<b>121±42</b>	122±45	126±38	111±38
ApoE (mg/dL)	<b>9.8 (6.8)</b>	9.7±7.0	10.2±6.5	9.6±6.2

Data are presented as mean ± standard deviation for continuous variables with a normal distribution, median (interquartile range) for continuous variables with a non-normal distribution, and percentage (number) for categorical variables. Non Lp(a)-apoB100 corresponds to the molar concentration of apo(a) subtracted from the molar concentration of apoB100, and is expressed in mg/dL using apoB100 molecular weight of 521,858 Da for conversion. It corresponds to the total amount of apoB100 specifically present on VLDL, IDL, and LDL. The size of apo(a) corresponds to the size of the smaller isoform when two isoforms were present. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. the other groups.

**Table 2: Changes in apolipoproteins and plasma lipids following PCSK9i treatment**

	Entire cohort		Evolocumab 140 mg		Alirocumab 150 mg		Alirocumab 75 mg	
	% change	Absolute change	% change	Absolute change	% change	Absolute change	% change	Absolute change
<b>Apo(a)</b> nmol/L	<b>-36±35</b>	<b>-41±62</b>	-44±34	-51±64	-34±37	-36±63	<b>-21±26***</b>	<b>-28±46*</b>
<b>ApoB100</b> mg/dL	<b>-47±17</b>	<b>-60±27</b>	-48±15	-61±25	-51±18	-66±27	<b>-38±17***</b>	<b>-46±26***</b>
<b>Non Lp(a)- apoB100</b> mg/dL	<b>-48 ±18</b>	<b>-58±27</b>	-49±16	-58±25	-52±19	-64±27	<b>-40±18**</b>	<b>-45±26**</b>
<b>ApoE</b> mg/dL	<b>-39±25</b>	<b>-4.1±4.4</b>	-41±26	-4.0±3.5	-40±23	-4.5±5.4	-30±25	-3.6±4.7
<b>ApoC-III</b> mg/dL	<b>-23±51</b>	<b>-1.1±1.8</b>	-33±29	-1.2±1.6	-17±71	-1.0±2.2	-10±48	-0.8±1.7
<b>TC</b> mg/L	<b>-38±14</b>	<b>-91±40</b>	-39±12	-94±39	-42±14	-100±38	<b>-31±13***</b>	<b>-67±38***</b>
<b>LDL-C</b> mg/dL	<b>-57±18</b>	<b>-88±37</b>	-59±16	-91±35	-60±19	-97±35	<b>-48±18***</b>	<b>-65±35***</b>
<b>HDL-C</b> mg/dL	<b>11±20</b>	<b>4.7±7.4</b>	12±25	4.7±7.6	9±13	4.2±6.7	11±17	5.6±8.2
<b>TG</b> mg/dL	<b>-15±33</b>	<b>-39±66</b>	-14±37	-39±69	-20±26	-38±55	-11±32	-39±77

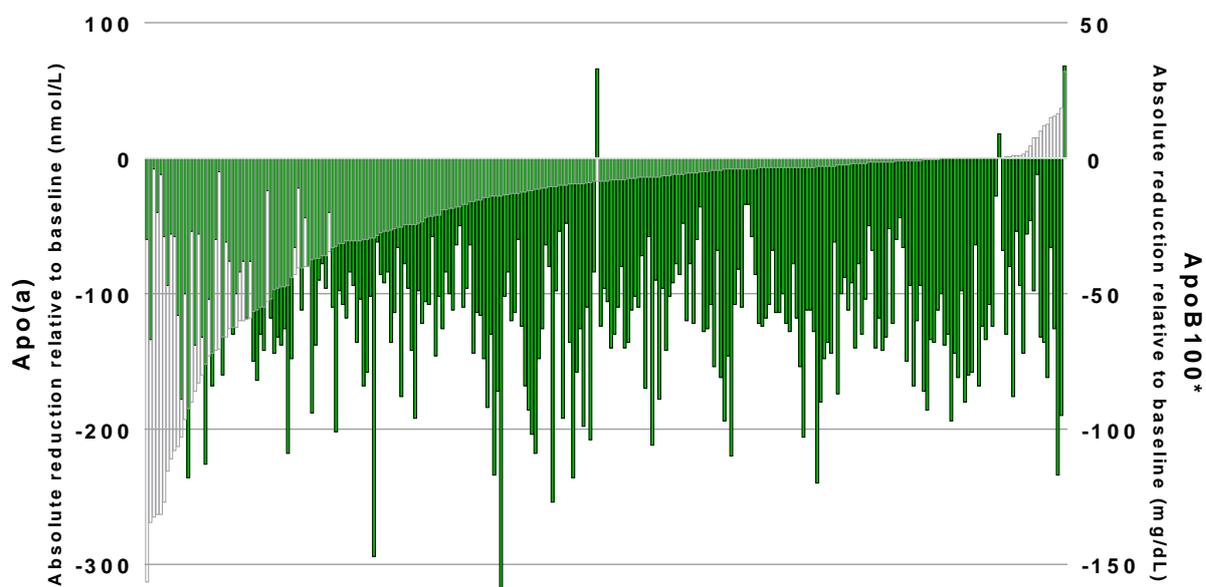
Relative (%) and absolute (mg/dL or nmol/L) changes are presented as mean ± standard deviation. \* p<0.05, \*\*

p<0.01, and \*\*\* p<0.001 compared with both Evolocumab-140mg and Alirocumab-150 mg groups.

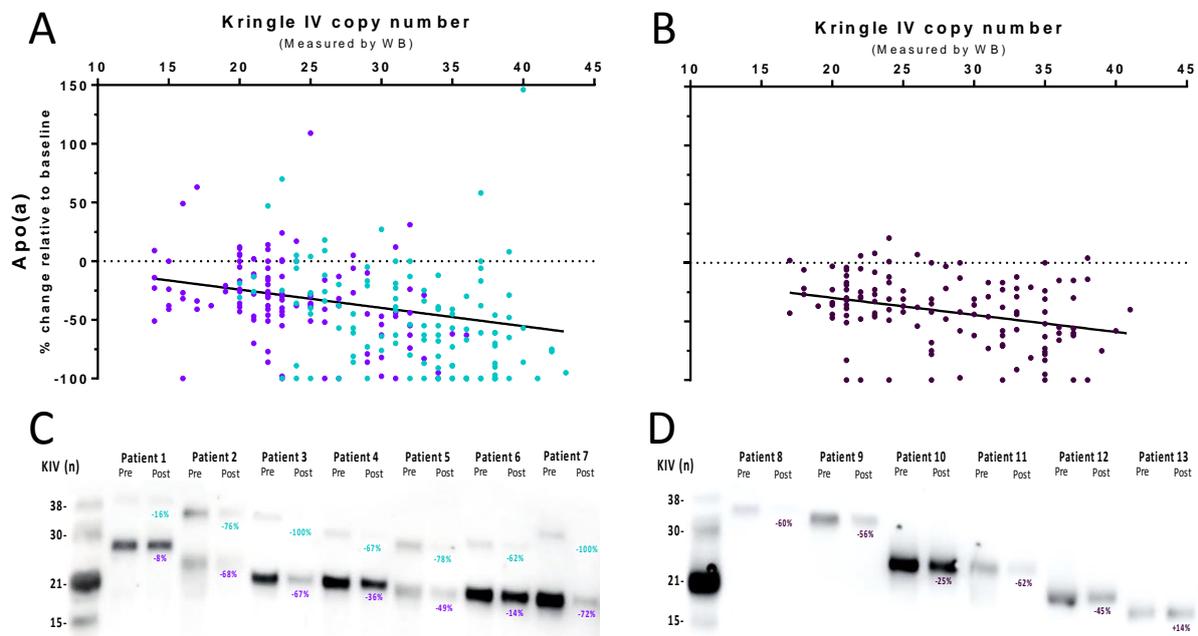
**Table 3: Positive association between the size of apo(a) and the percent reduction in apo(a)/Lp(a) plasma levels following PCSK9i treatment.** – The number of KIV determined by western blot was used as the explanatory variable (the smaller of both for patients who displayed two isoforms). The outcome (i.e. dependent variable) was the log transformed apo(a)/Lp(a) value at follow-up visit. Associations were adjusted for baseline Lp(a), sex, age, PCSK9i treatment, apoE genotype, apoE plasma levels, renal function (eGFR), and statin intensity treatment.  $\beta$  coefficients refer to the percent reduction in apo(a)/Lp(a) for a one-unit increment in the explanatory variable.

Model adjusted for	Percentage decrease of Lp(a) for each increase in apo(a) isoform by one KIV domain		
	beta	se	p-value
Baseline Lp(a)	0.0265	0.0073	0.0003
Baseline Lp(a), sex, age	0.0282	0.0072	0.0002
Baseline Lp(a), sex, age, PCSK9i treatment arm	0.0283	0.0071	<0.0001
Baseline Lp(a), sex, age, APOE genotype	0.0281	0.0074	0.0002
Baseline Lp(a), sex, age, ApoE plasma levels	0.0276	0.0072	0.0002
Baseline Lp(a), sex, age, eGFR	0.0336	0.0094	0.0005
Baseline Lp(a), sex, age, Statin intensity treatment	0.0285	0.0071	<0.0001

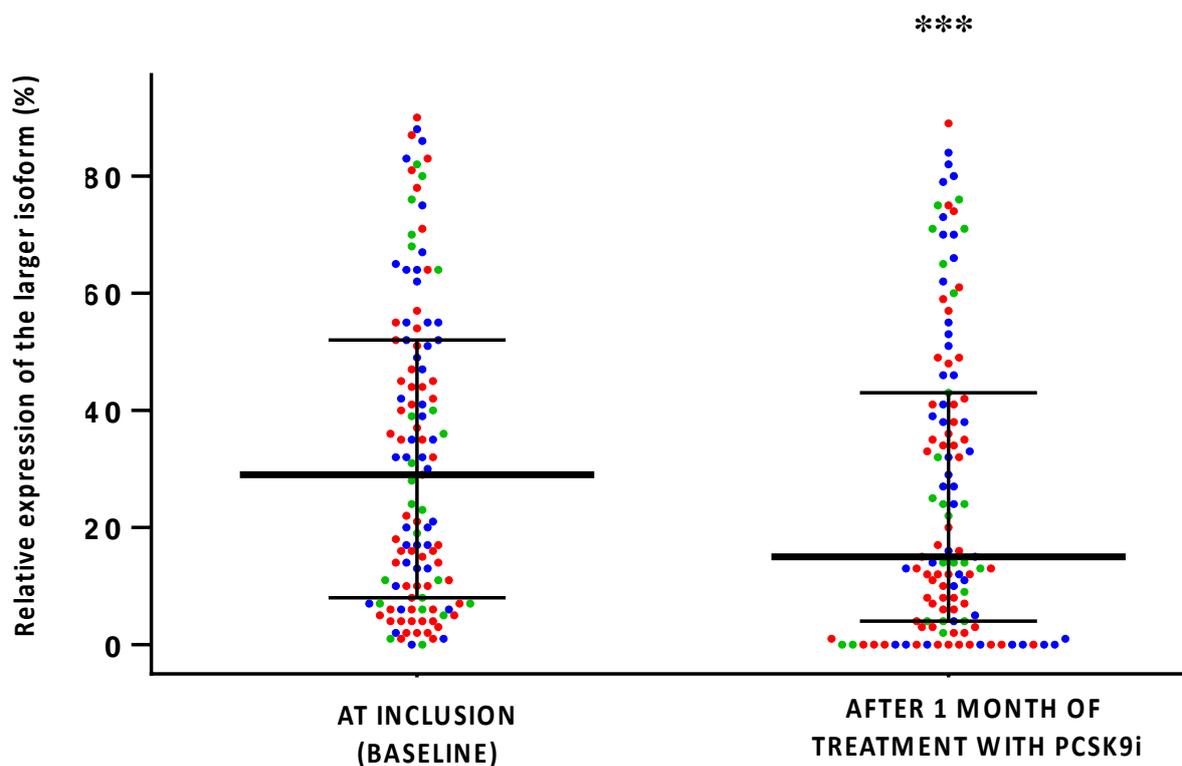
**Figure 1: Absence of correlation between individual changes in apoB100 and apo(a) following PCSK9i treatment.** Patients (n=268) were ranked in function of their absolute reductions in plasma Lp(a) levels following PCSK9i treatment (grey histogram bars / left vertical axis). Absolute changes in plasma apoB100 levels specifically present on VLDL, IDL, and LDL (green histogram bars / right vertical axis) are superimposed.



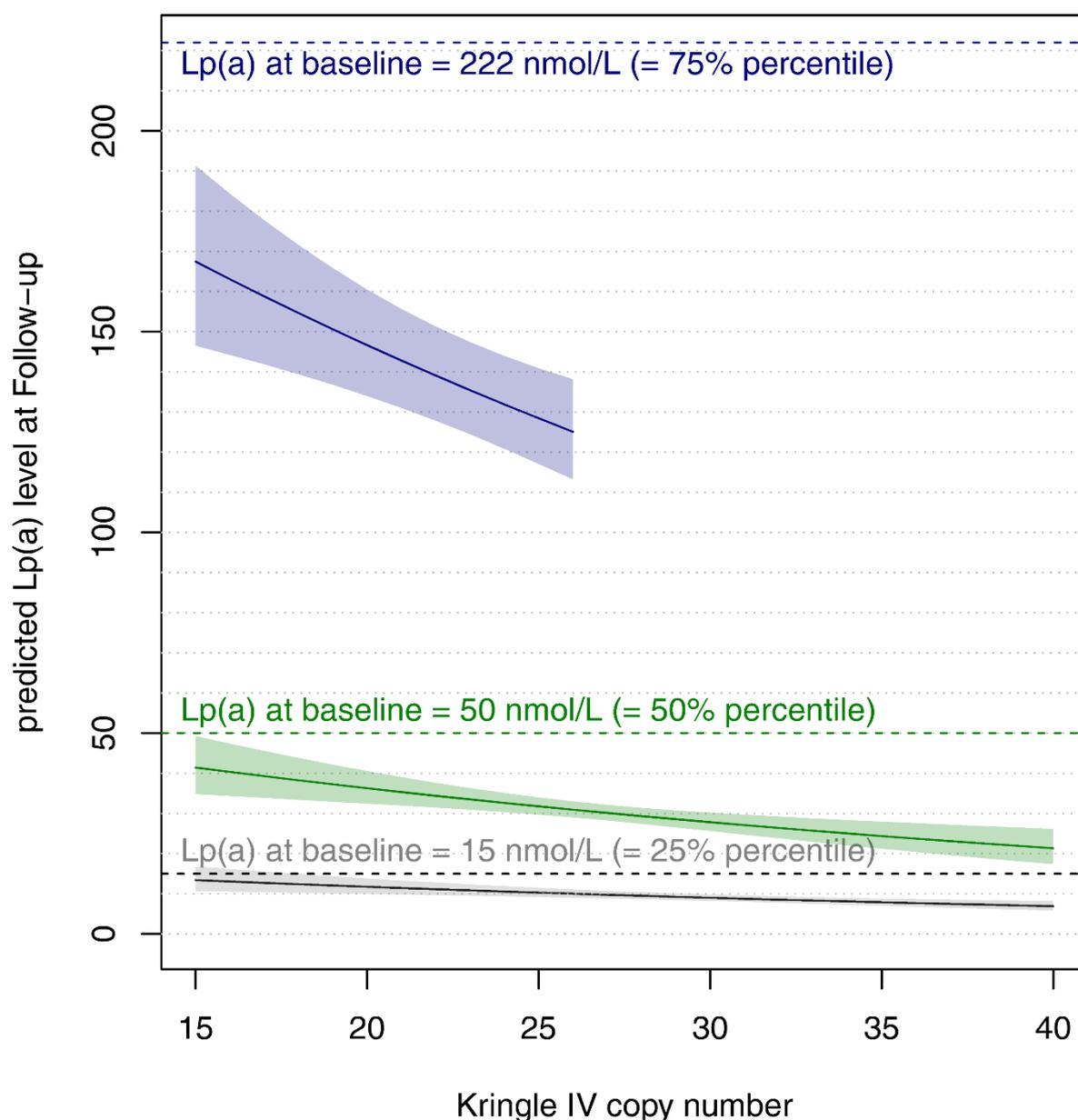
**Figure 2: The relative changes in apo(a)/Lp(a) induced by PCSK9i augments with the size of apo(a).** The expression of apo(a) in equal volumes of plasma isolated from each patient at inclusion and after one month of PCSK9i treatment was assessed by Western blot. Changes in apo(a) expression between inclusion and one month were assessed by densitometry for each apo(a) isoform. In samples with two detectable apo(a) isoforms (n=122), the relative changes from baseline of each isoform was plotted against its number of KIV. Smaller isoforms and larger isoforms are depicted in purple and blue, respectively (**panel A**). In samples with only one detectable apo(a) isoform (n=129), the relative changes from baseline of that isoform was plotted against its number of KIV and is depicted in violet (**panel B**). Representative examples of changes in apo(a) isoforms expression in function their size for patients with two detectable bands (**panel C**) and for patients with only one detectable band (**panel D**) are displayed.



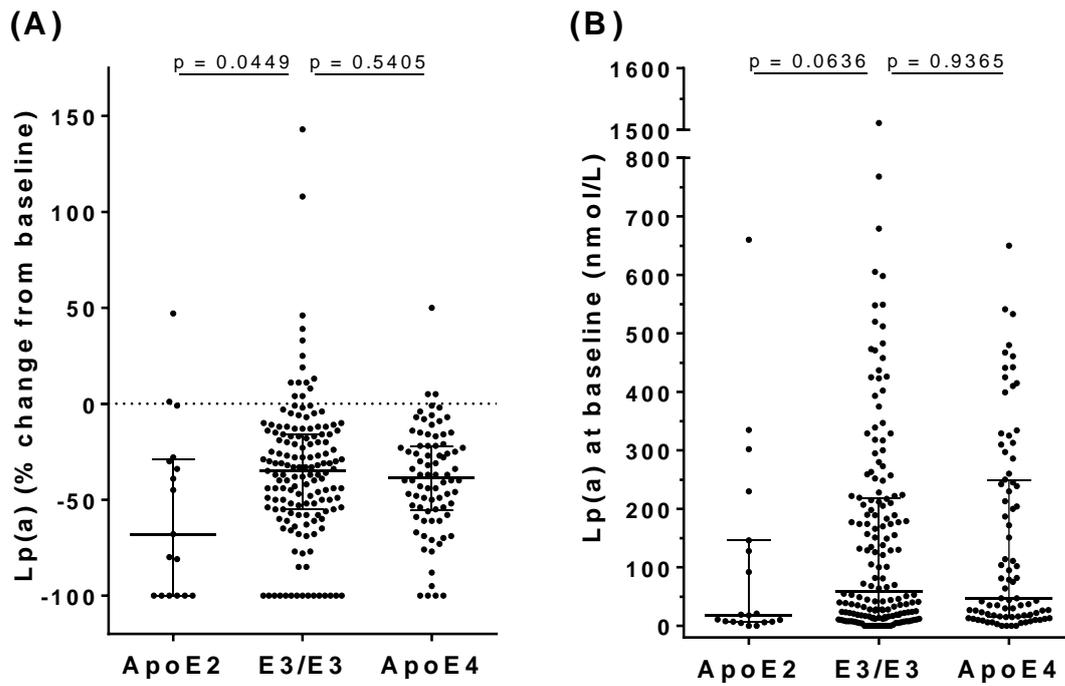
**Figure 3: The contribution of the larger apo(a) isoform to the total concentration of apo(a)/Lp(a) is reduced by PCSK9i.** The relative expression of the larger isoform of apo(a) in each patient with two detectable bands (n=122) was assessed at time of inclusion and one month after treatment with either Evolocumab 140mg (Red dots), Alirocumab 75 mg (Green dots) and Alirocumab 150 mg (Blue dots). \*\*\*, p=0.0001 vs. baseline.



**Figure 4: Prediction of patients Lp(a) levels after 4 weeks of PCSK9i treatment in function of the number of KIV on their smaller apo(a) isoform.** The prediction is shown for three hypothetical patients with baseline Lp(a) values at the 25<sup>th</sup> percentile (15nmol/L in **grey**), at the 50<sup>th</sup> percentile (50 nmol/L in **green**), and at the 75<sup>th</sup> percentile (222 nmol/L in **purple**). No patient above the 75<sup>th</sup> percentile had more than 26 KIV repeats. The lines in color correspond to the mean predicted Lp(a) level at follow up. The shaded strips represent confidence intervals.



**Figure 5: Reduction in Lp(a) induced by PCSK9i among carriers of different apoE isoforms.** The percent changes in Lp(a) following PCSK9i treatment in carriers of the apoE2 isoform (E2/E2 and E2/E3; n=19), in homozygous carriers of the apoE3 isoform (E3/E3; n=162), and in carriers of the apoE4 isoform (E3/E4 and E4/E4; n=84) are displayed in **(panel A)**. Apo(a)/Lp(a) plasma levels measured at inclusion (baseline) are displayed in **(panel B)**. The apoE2/E4 carriers (n=3) were excluded. Data are presented as median with interquartile range.



**Supplemental Table S1: Inclusion list for PRM analysis**

Apo	Sequence	Transitions (m/z)	NCE	Fragments
Apo(a)	LFLEPTQADIALLK	786.4558 → 1069.6252, 743.4662, 557.4021, 444,3180	28	y <sub>10</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
Apo(a) (IS)	LFLEPTQADIALL- [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]K	790.4629 → 1077.6394, 751.4804, 565.4163, 452.3322		y <sub>5</sub> <sup>+</sup> y <sub>4</sub> <sup>+</sup>
ApoE	LGPLVEQGR	484.7798 → 701.3941, 588.3100, 489.2416, 360.1990	28	y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoE (IS)	LGPLVEQG-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	489.7840 → 711.4023, 598.3183, 499.2499, 370.2073		y <sub>4</sub> <sup>+</sup> y <sub>3</sub> <sup>+</sup>
ApoE2	(C)LAVYQAGAR	554.7820 → 835.4421, 764.4050, 665.3365, 502.2732	28	y <sub>8</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoE2 (IS)	(C)LAVYQAGA-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	559.7862 → 845.4503, 774.4132, 675.3448, 512.2815		y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoE4	LGADMEDVR	503.2371 → 892.3829, 835.3614, 764.3243, 649.2974	28	y <sub>8</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoE4 (IS)	LGADMEDV-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	508.2413 → 902.3912, 845.3697, 774.3326, 659.3057		y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>5</sub> <sup>+</sup>
ApoE2/E3	LGADMEV(C)GR	611.7632 → 981.3764, 866.3495, 735.3090, 491.2395	28	y <sub>8</sub> <sup>+</sup> y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
ApoE2/3 (IS)	LGADMEV(C)G-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	616.7673 → 991.3847, 876/3578, 745.3173, 501.2477		y <sub>6</sub> <sup>+</sup> y <sub>4</sub> <sup>+</sup>
ApoE3/E4	LAVYQAGAR	474.7667 → 764.4050, 665.3365, 502.2732, 374.2146	28	y <sub>7</sub> <sup>+</sup> y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
ApoE3/E4 (IS)	LAVYQAGA-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]R	479.7708 → 774.4132, 675.3448, 512.2815, 384.2229		y <sub>5</sub> <sup>+</sup> y <sub>4</sub> <sup>+</sup>

KIV: Kringle; NCE: Normalized Collision Energy; (C): alkylated cysteine with mass shift of +57.0214

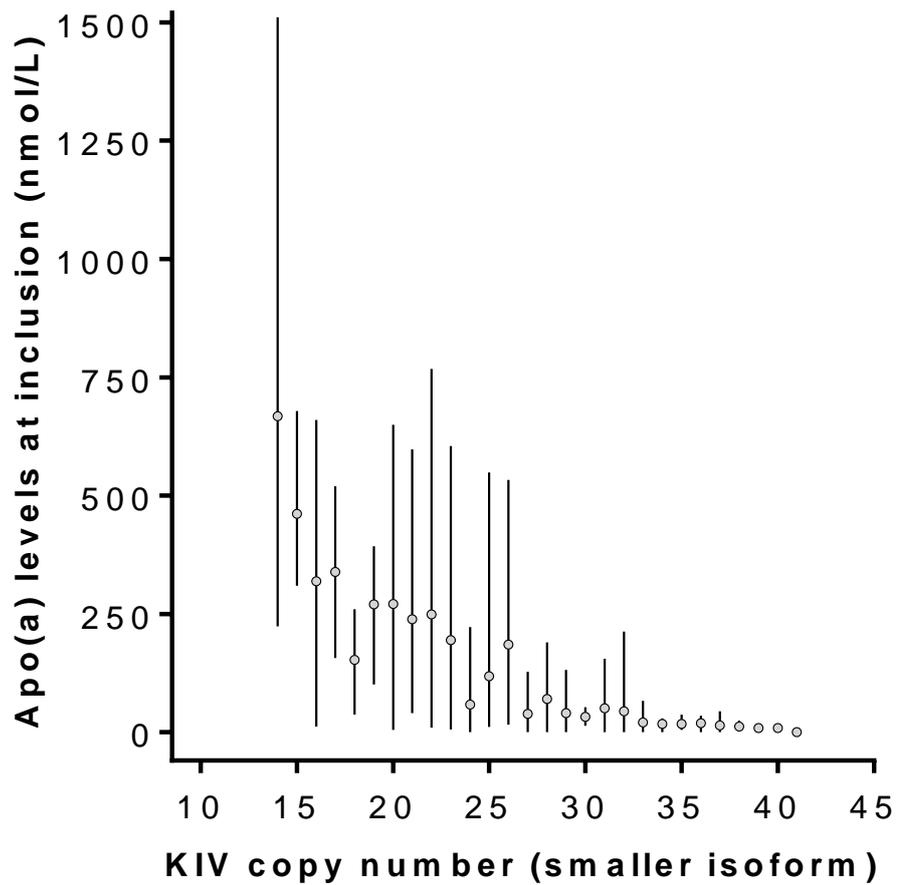
m/z

**Supplemental table S2: Gradient scheme for LC-HRMS analysis.**

<b>Column</b>	Aeris™ 1.7 µm, 100 x 2.1 mm, PEPTIDE XB-C18
<b>Mobile phase A</b>	0.1% formic acid in 5/95 (acetonitrile/water; v/v)
<b>Mobile phase B</b>	0.1% formic acid in acetonitrile
<b>Linear gradient</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B = 1% for 1 min</li> <li>• 1% to 29% in 9 min</li> <li>• 29% to 95% in 0.5 min</li> <li>• 95% for 1 min</li> <li>• 95% to 1% in 0.5 min</li> <li>• 1% for 1.5 min</li> </ul>
<b>Flow rate</b>	350 µL/min
<b>Injection volume</b>	30 µL
<b>Column temperature</b>	60°C
<b>Polarity</b>	Positive HESI mode
<b>Capillary voltage</b>	3 kV
<b>Sheath gas flow rate</b>	48.75
<b>Aux gas flow rate</b>	11.88
<b>Capillary temperature</b>	250°C
<b>Desolvatation temperature</b>	400 °C
<b>Desolvatation gas</b>	Dinitrogen N <sub>2</sub>
<b>HCD cell gas</b>	Dinitrogen N <sub>2</sub>
<b>Acquisition mode</b>	PRM (MS/MS)
<b>Resolution</b>	35,000
<b>AGC target</b>	2e5
<b>Maximum IT</b>	120 ms
<b>Isolation window</b>	1.4 m/z

HCD: High collision dissociation

**Supplemental Figure 1: Baseline apo(a) levels are inversely correlated with the size of apo(a) isoforms.** Apo(a) size is defined as KIV copy number of the smaller expressed apo(a) isoform. Apo(a) levels for each KIV copy number are representing median (minimum-maximum).



## **Discussion et perspectives**

Notre étude a permis de répondre à trois problématiques différentes concernant l'effet de l'inhibition de PCSK9 sur les taux de Lp(a). Premièrement, nos résultats montrent que les inhibiteurs de PCSK9 réduisent les niveaux de Lp(a) par une autre voie que celle du LDLR. Deuxièmement, nous avons montré que la taille de l'apo(a) est un élément clé dans l'efficacité des inhibiteurs de PCSK9 sur la réduction des concentrations en Lp(a). Enfin, bien que l'apoE et ses isoformes majoritaires régulent les niveaux de bases de la Lp(a), nous n'avons pas observé d'effet spécifique et indépendant du phénotype de l'apoE sur la réduction de la Lp(a).

De nombreuses études ont montré une faible corrélation positive entre la réduction des concentrations de Lp(a) et la réduction du LDL cholestérol induites par les inhibiteurs de PCSK9 (Gaudet et al., 2014; Raal et al., 2014; Sullivan et al., 2012; Stein et al., 2012). Cependant toutes ces études n'ont pas tenu compte de la teneur en cholestérol de la Lp(a). Comme les patients traités par des inhibiteurs de PCSK9 sont à haut risque cardiovasculaire, ils présentent des concentrations de Lp(a) en général plus élevées que celles de la population générale. Ceci induit un biais important dans le calcul du LDL cholestérol qui peut être largement surestimé. Dans cette étude, nous avons développé une méthode plus précise pour déterminer l'effet des inhibiteurs de PCSK9 sur les lipoprotéines à apoB100 en excluant la Lp(a). Les lipoprotéines à apoB100 ne contiennent qu'une seule molécule d'apoB100 et la Lp(a) ne contient qu'une seule molécule d'apoB100 et d'apo(a). Par conséquent, les concentrations molaires d'apoB100 et d'apo(a) sont égales au nombre de particules de lipoprotéines à apoB100 et de Lp(a), respectivement. Dès lors, il est possible de déterminer le nombre de particules de VLDL/IDL/LDL séparément du nombre de particules de Lp(a). Par cette approche, nous avons montré une forte discordance ainsi qu'une absence totale de corrélation ( $r = -0,078$  ;  $p = 0,201$ ) entre la diminution induite par les inhibiteurs de PCSK9 sur les niveaux de Lp(a) et d'apoB100 liée aux VLDL/IDL/LDL. Bien que la Lp(a) contienne une molécule d'apoB100 (ligand naturel du LDLR), ces résultats suggèrent que le LDLR n'est pas ou est peu impliqué dans la capture et l'épuration de la Lp(a).

Nous avons précédemment confirmé que les isoformes de l'apoE, en particulier l'apoE2, modulaient les niveaux de Lp(a) (Blanchard et al., 2019; Kritharides et al., 2017; Moriarty et al., 2017). Dans la présente étude, aucune différence significative n'a été trouvée entre les concentrations basales de Lp(a) des phénotypes à apoE2 (E2/E2 et E2/E3) et à apoE4 (E3/E4

et E4/E4) par rapport au phénotype E3/E3 ( $p = 0,0636$  et  $p = 0,9365$ , respectivement). Le manque de puissance statistique dû au faible nombre de patients porteurs des isoformes d'apoE2 et d'apoE4 pourrait expliquer l'absence de différence significative. Cependant, les patients E2/E2 et E2/E3 ont présenté une diminution relative de Lp(a) médiée par les inhibiteurs de PCSK9 significativement plus élevée que les patients E3/E3 ( $p = 0,0449$ ), alors qu'aucune différence n'a été observée entre les patients E3/E4 et E4/E4 et les patients E3/E3 ( $p = 0,5405$ ). La diminution relative de la Lp(a) est inversement corrélée aux niveaux de Lp(a) avant traitement car les concentrations de Lp(a) initialement basses atteignent plus facilement des niveaux nuls, c'est-à-dire une diminution de 100%. Nous avons également exploré la relation entre l'apoE et la diminution de la Lp(a) par les inhibiteurs de PCSK9, indépendamment des isoformes apoE2, apoE3 et apoE4. La diminution relative de Lp(a) était positivement corrélée à la diminution relative d'apoE totale ( $r = 0,3394$  ;  $p < 0,0001$ ). Cependant après ajustement sur les concentrations basales de Lp(a), cette corrélation n'était plus significative (données non présentées). Ces résultats suggèrent que l'apoE et ses isoformes sont probablement associées à la réduction de la Lp(a) induite par l'inhibition de PCSK9 mais que cette association n'est due qu'à la faiblesse relative des niveaux de Lp(a) chez les porteurs de l'isoforme E2.

Le résultat majeur de notre étude réside dans l'influence de la taille de l'apo(a) sur la diminution relative des concentrations de Lp(a). Le pourcentage de diminution de Lp(a) induit par les inhibiteurs de PCSK9 augmente d'environ 3% pour chaque domaine KIV<sub>2</sub> supplémentaire sur l'apo(a) et ce, même après ajustement sur l'âge, le sexe, le taux basal de Lp(a), le taux de filtration glomérulaire, le génotype de l'apoE, la dose et le type d'inhibiteur de PCSK9 et la combinaison ou non d'un traitement avec des statines ( $p < 0,0001$ ). Concrètement, pour deux patients présentant des taux de Lp(a) similaires, celui porteur d'isoformes d'apo(a) de plus grande taille enregistrera une diminution relative de Lp(a) plus importante. Par ailleurs, nous avons confirmé ces observations chez les patients présentant une seule isoforme d'apo(a) comme chez les patients présentant deux isoformes d'apo(a) détectables par Western Blot. Une autre étude basée sur la même approche a montré que la taille d'apo(a) avait également une influence sur la diminution relative de Lp(a) induite par la niacine (Parish et al., 2018). Des études mécanistiques seraient nécessaires pour expliquer ces résultats. Comme les niveaux de Lp(a) plasmatiques sont en majorité contrôlés par la production d'apo(a), nous pensons que les inhibiteurs de PCSK9 circulant pourraient indirectement agir sur la synthèse ou la sécrétion d'apo(a) dans la cellule, en ciblant préférentiellement les grandes isoformes qui sont par ailleurs plus longues à synthétiser. Une autre hypothèse, moins probable, serait que l'assemblage de la

Lp(a) pourrait être inhibé par les inhibiteurs de PCSK9 dans le plasma en empêchant la fixation de l'apo(a) à une lipoprotéine de type LDL *via* l'apoB100. Cette hypothèse repose elle-même sur l'hypothèse non confirmée, que la formation de la Lp(a) aurait lieu dans le plasma après sécrétion d'apo(a) libre par les hépatocytes. Cependant dans ces conditions, les concentrations plasmatiques d'apo(a) mesurées resteraient en principe inchangées.

# **DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION**

# Discussion générale

Une concentration élevée de Lp(a) est aujourd'hui pleinement reconnue comme un facteur de risque cardiovasculaire majeur dans le monde de la lipidologie et de la cardiologie. La Lp(a) reste cependant une lipoprotéine énigmatique car son métabolisme se distingue fortement des grandes voies métaboliques classiques des lipoprotéines et présente encore de nombreuses incertitudes. Par ailleurs, ses concentrations circulantes sont essentiellement contrôlées par la génétique. Les efforts de recherche la concernant ont connu une très nette résurgence des suites de la découverte de PCSK9, un inhibiteur naturel du LDLR, et surtout des anticorps thérapeutiques visant à inhiber son action. PCSK9 et le LDLR, sont des éléments centraux du métabolisme lipoprotéique et du cholestérol qui semblent en effet avoir une influence sur les niveaux plasmatiques de Lp(a). Plus récemment, l'apoE, une apolipoprotéine centrale du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, est également apparue comme déterminante dans la modulation des concentrations de la Lp(a). Cependant, les mécanismes par lesquels PCSK9, le LDLR ou l'apoE régulent le métabolisme de la Lp(a) n'ont pas été élucidés.

L'objectif de ce travail de thèse était donc d'investiguer le métabolisme de la Lp(a) par des approches biochimiques, épidémiologiques et cliniques afin d'apporter de nouveaux éléments de compréhension quant aux mécanismes pouvant participer à sa production, son assemblage et son catabolisme. Ces travaux de recherche ont été organisés en trois selon trois axes majeurs : (1) la mise en place d'une technique de séparation des différentes isoformes de l'apo(a) sur gel d'agarose pour déterminer la taille exacte de l'apo(a), et le développement d'une méthode de spectrométrie de masse pour l'analyse statique et dynamique de la Lp(a) et de ses apolipoprotéines, (2) l'étude de l'influence de l'apoE et de ses isoformes sur les niveaux de Lp(a) et (3) l'étude de deux thérapies hypolipémiantes, les inhibiteurs de PCSK9 et l'aphérèse, capables de réduire efficacement les concentrations plasmatiques de la Lp(a) et le risque cardiovasculaire associé.

## ***Développement de nouvelles approches méthodologiques pour l'analyse des apolipoprotéines***

**Détermination de la taille exacte de l'apo(a)** – La séparation des protéines est généralement réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS PAGE). Cependant, cette technique ne permet pas de séparer correctement les grosses protéines de plus de 200 kDa car la polymérisation de l'acrylamide génère des mailles trop petites pour qu'elles puissent migrer convenablement. Comme la plus petite des isoformes d'apo(a) (1 KIV<sub>2</sub> ou 10 KIV) a un poids moléculaire supérieur à 300 kDa, la séparation de deux isoformes d'apo(a) chez un même individu est difficilement réalisable par SDS PAGE. Par conséquent, nous avons développé une méthode spécifique de Western Blot sur gel d'agarose en présence de SDS, généralement utilisée pour la séparation de l'ADN. La mise en place du protocole expérimental a nécessité de longues semaines d'ajustements et requiert un soin particulier pour obtenir une résolution optimale. En effet, une meilleure séparation des bandes est nécessaire pour pouvoir distinguer deux isoformes d'apo(a) d'un même individu de taille très proche (différence de 1 à 2 KIV). De plus, la différence de concentrations entre deux isoformes d'apo(a), chez un même patient, peut être très importante. Lors de la révélation des membranes, le contraste entre l'intensité des deux bandes peut empêcher la détection de l'isoforme la moins exprimée. Par conséquent, certains patients peuvent être considérés, à tort, comme des homozygotes. C'est également le cas lorsqu'un individu exprime deux isoformes de même taille. Outre la détermination de la taille exacte de l'apo(a), cette méthode permet, de manière répétable, d'évaluer l'expression de chacune des deux isoformes chez les individus hétérozygotes. Ainsi, lorsque la concentration molaire d'apo(a) totale est connue, il est possible d'estimer avec précision la contribution relative de chaque isoforme.

**Analyse quantitative et détermination du polymorphisme des apolipoprotéines** – Les particularités biochimiques de la Lp(a) font que les méthodes d'analyses immunologiques traditionnelles possèdent de nombreuses limites pour son étude et sa caractérisation ([Scharnagl et al., 2019](#)). Nous avons montré que l'analyse quantitative par LC-MS/MS offre une alternative fiable pour l'analyse des apolipoprotéines ([Blanchard et al., 2020](#)). Cette technique implique l'hydrolyse enzymatique contrôlée du mélange complexe de protéines contenu dans l'échantillon biologique (plasma, sérum, lipoprotéines). Les peptides signatures de chaque protéine d'intérêt ainsi générés sont ensuite séparés puis détectés par LC-MS/MS. L'utilisation de courbes étalons générées à partir de solutions standards de peptides de synthèse permet de

quantifier avec une grande précision chaque peptide signature (ou protéotypique) issu de la protéolyse enzymatique. Les lois de la stœchiométrie permettent enfin d'obtenir les concentrations molaires des protéines étudiées (van den Broek et al., 2016).

Depuis l'élaboration et la publication du premier protocole expérimental en 2015 par notre groupe (Croyal et al., 2015), cette technique a connu de nombreux ajustements et améliorations. A présent, nous sommes en mesure de quantifier simultanément 18 apolipoprotéines à partir de petits volumes d'échantillon (de 20 à 40  $\mu$ L de plasma). Le temps nécessaire à la préparation et à l'analyse LC-MS/MS de 100 échantillons est d'environ trois jours, ce qui permet un gain de temps considérable par rapport aux méthodes de dosage conventionnelles (ELISA, néphélogométrie, immuno-turbidimétrie), en particulier pour l'étude de grandes cohortes de patients. Contrairement aux kits immunologiques, l'analyse par spectrométrie de masse permet de mesurer les taux d'apo(a) et d'estimer précisément le nombre de KIV moyen chez un même individu (Blanchard et al., 2020). De plus, les mutations faux-sens ou non-sens entraînant respectivement la substitution d'un acide aminé (isoformes de l'apoE et de l'apoL1) ou la troncature prématurée (apoB48 *versus* apoB100) des protéines, peuvent également être détectées et dosés par spectrométrie de masse en raison de la modification du poids moléculaire des peptides générés par protéolyse. De récents travaux ont également révélé la capacité de la spectrométrie de masse pour l'analyse qualitative et quantitative de modifications post-traductionnelles des apolipoprotéines (Nedelkov, 2017).

**Analyse des flux métaboliques des apolipoprotéines** – Outre l'analyse quantitative multiplexée et l'identification de mutations polymorphiques, la spectrométrie de masse permet d'explorer les flux métaboliques des apolipoprotéines par l'intermédiaire d'études cinétiques *in vivo* impliquant des traceurs enrichis en isotopes stables (Barrett et al., 2006). Dans le cadre de l'étude cinétique de protéines, un précurseur de synthèse exogène, comme la  $^2\text{H}_3$ -leucine, est injecté au patient. De manière similaire à la quantification des apolipoprotéines, les plasmas ou les fractions lipoprotéiques sont digérés pour obtenir un mélange complexe de peptides analysable par spectrométrie de masse. Pour ces études, le choix du peptide signature est d'autant plus essentiel puisqu'il doit contenir au moins une leucine. L'analyse par spectrométrie de masse consiste ensuite à mesurer l'enrichissement en  $^2\text{H}_3$ -leucine du peptide signature, c'est-à-dire le degré d'incorporation du traceur au cours du temps dans la néo-synthèse de la protéine endogène. La modélisation mathématique des courbes cinétiques générées donne accès aux vitesses de catabolisme et de production de la protéine ciblée (Barrett et al., 2006).

A l'instar de l'analyse quantitative, le premier protocole expérimental développé par notre groupe pour l'étude cinétique de protéines plasmatiques a été mise en place en 2015 spécifiquement pour l'apo(a) (Croyal et al., 2015). L'étude cinétique des isoformes de l'apoE a, quant à elle, été développée en début de thèse (2018) et a permis de démontrer toutes les capacités analytiques de la LC-MS/MS en combinant le phénotypage quantitatif des isoformes de l'apoE dans le plasma et dans les fractions lipoprotéiques à la mesure de leurs enrichissements (Blanchard et al., 2018). La limite majeure de cette étude, d'un point de vue analytique, résidait dans le manque de sensibilité pour mesurer les enrichissements respectifs des différentes isoformes de l'apoE dans les fractions lipoprotéiques. Ceci était en grande partie lié aux caractéristiques intrinsèques des peptides signatures des isoformes de l'apoE imposés par le polymorphisme de l'apoE. Une alternative serait donc de valider nos observations chez des patients homozygotes à l'aide du peptide signature commun à toutes les isoformes utilisé pour la quantification de l'apoE totale (10 fois plus sensible). Par ailleurs, les nouveaux spectromètres de masse, dont la sensibilité a considérablement augmenté ( $\times 50$ ), pourraient permettre de mesurer ces très faibles enrichissements. À noter que les études cinétiques sont onéreuses ( $\sim 10\,000\text{€}/\text{sujet}$ ) et difficiles à mettre en place. En outre, le protocole clinique est long et contraignant pour les sujets testés qui doivent rester immobiles pendant plusieurs heures.

**Les systèmes de spectrométrie de masse** – Bien que les appareils de chromatographie liquide soient dans l'ensemble relativement similaires, il existe de nombreux systèmes de spectrométrie de masse avec des capacités distinctes. Par exemple, les systèmes de basse résolution comme le quadripôle restent les plus adaptés pour les analyses quantitatives car ils présentent une bonne sensibilité et une excellente gamme linéaire. Par ailleurs, ils atteignent un haut niveau de spécificité lorsqu'ils sont utilisés en tandem ce qui compense leur faible résolution. A l'inverse, les systèmes de haute résolution comme l'Obitrap<sup>®</sup> et le temps de vol (TOF, « Time of Flight ») sont plus adaptés pour des applications dites « non ciblées » en protéomique pour la recherche et l'identification de biomarqueurs de diverses pathologies. Ces systèmes peuvent toutefois être utilisés pour des analyses « ciblées », comme la quantification de protéines, mais leur gamme linéaire est réduite ce qui conduit à plus d'ajustements techniques.

Enfin, la spectrométrie de masse reste une technique coûteuse ( $> 300\text{ k€}$ ) qui requiert de nombreux frais d'entretien ( $> 10\text{ k€}/\text{an}$ ) et n'est donc pas accessible à tous les laboratoires. De plus, les spectromètres de masse sont des appareils complexes qui nécessitent une longue formation préalable pour les maîtriser et les utiliser convenablement (Croyal, 2017).

## ***Influence de l'apoE et de ses isoformes sur les niveaux de Lp(a)***

**L'apoE des VLDL régule la production de la Lp(a)** – De nombreuses études, dont celle de notre groupe, indiquent que les variations interindividuelles des niveaux de Lp(a) s'expliquent principalement par les vitesses de production de la particule (Chan et al., 2019; Croyal et al., 2015; Rader et al., 1993). Nos travaux ont permis de montrer que les concentrations et la vitesse de production de la Lp(a) étaient positivement corrélées avec les taux de production de l'apoE des VLDL, indépendamment de la fonctionnalité du LDLR des patients étudiés (Croyal et al., 2020). La deuxième partie de notre étude, traitant de l'effet de la niacine sur les paramètres cinétiques de l'apo(a) chez des patients hypertriglycéridémiques, nous a permis de conforter ces observations. La diminution du taux de production de l'apoE des VLDL induite par la niacine était positivement corrélée avec la réduction du taux de production de l'apo(a), suggérant que la sécrétion de l'apo(a) ou de la particule de Lp(a) dans la circulation pourrait en partie être gouvernée par l'apoE des VLDL. La corrélation positive entre la diminution la vitesse de production de l'apoE des VLDL et la diminution des concentrations de PCSK9 démontre qu'un lien existe également entre l'apoE et PCSK9. Cependant la diminution des concentrations de PCSK9 induite pas la niacine n'était pas corrélée avec la diminution du taux de production de l'apo(a), bien qu'une tendance presque significative ait été observée (Croyal et al., 2020). Un plus grand nombre de patients permettrait peut-être d'atteindre la significativité statistique, c'est pourquoi nous ne pouvons pas exclure un rôle de PCSK9 dans les mécanismes de régulation de la Lp(a). Une étude réalisée sur des souris a d'ailleurs montré qu'en plus de dégrader le LDLR, PCSK9 pouvait induire une activation de la lipogénèse hépatique par des mécanismes non établis impliquant l'apoE et le LDLR (Tavori et al., 2016b). Malheureusement la Lp(a) n'a pas été investiguée dans cette étude car les souris ne produisent pas d'apo(a).

À noter cependant que notre étude a été réalisée sur des patients porteurs du phénotype E3/E3 à l'exception d'un patient diagnostiqué E3/E4. Ainsi, les résultats que nous avons montrés ne témoignent que de l'influence de l'apoE3 sur la Lp(a).

**L'apoE2 est associée à une réduction des taux de Lp(a) et du risque cardiovasculaire associé** – Plusieurs études génétiques ont montré que le polymorphisme du gène *APOE* avait une influence sur les taux plasmatiques de la Lp(a) (Erhart et al., 2018; Mack et al., 2017; Li et al., 2015) et de nombreuses études observationnelles ont confirmé cette relation. Deux d'entre elles, réalisées sur de très larges cohortes d'individus issus de la population générale, ont notamment permis d'affirmer avec certitude une réduction de la Lp(a) chez les porteurs de

l'isoforme apoE2, par rapport aux porteurs de l'isoforme apoE3 (Kritharides et al., 2017; Moriarty et al., 2017). A l'inverse, l'isoforme apoE4 semble être associée à une augmentation de la Lp(a) par rapport à l'apoE3 (Moriarty et al., 2017) mais cet effet ne fait pas l'unanimité (Kritharides et al., 2017). Nous avons montré dans une cohorte de patients non traités atteints d'hypercholestérolémie familiale (FH) que l'apoE2 était effectivement associée à des taux de Lp(a) réduits et à un risque cardiovasculaire plus bas par rapport aux patients E3/E3 (Blanchard et al., 2019). L'absence de différences sur les concentrations de LDL cholestérol, de triglycérides, d'apoB100 ou de HDL cholestérol entre les patients porteurs FH de l'isoforme apoE2 et les patients FH porteurs des autres isoformes, indique que la cardio-protection associée à l'apoE2 est due au moins en partie à de plus faibles taux de Lp(a) (Blanchard et al., 2019). Beaucoup d'études attribuent cet effet à la différence d'affinité que présentent les isoformes de l'apoE pour le LDLR (Moriarty et al., 2017; Yeang et al., 2017). Comme l'apoE2 présente une affinité réduite pour le LDLR, ce dernier pourrait ainsi être plus disponible pour capter la Lp(a). Cependant, nous n'avons observé aucune corrélation entre les taux de Lp(a) et de PCSK9 dans cette cohorte alors que les concentrations de PCSK9 corrélaient avec les taux de LDL cholestérol (données non publiées), ce qui renforce l'hypothèse que le LDLR n'est pas ou peu impliqué dans les mécanismes de régulation de la Lp(a). L'étude cinétique de l'apoE chez des patients E2/E2 permettrait de déterminer si cette isoforme induit une réduction de la Lp(a) en augmentant son catabolisme et/ou en diminuant sa production, mais ce phénotype est malheureusement très rare, et il se traduit parfois par l'apparition d'une dysbétalipoprotéïnémie dont le phénotype liporotéique est très particulier par rapport au phénotype E2/E2 non pathologique.

**Quel rôle pour le LDLR ?** – Nos travaux ont permis de montrer que la vitesse de catabolisme de la Lp(a) n'était pas différente entre les patients porteurs de mutations GOF et LOF de *PCSK9*, et les patients porteurs de mutations sur le *LDLR* (Croyal et al., 2020). Ces résultats suggèrent que l'élévation des niveaux de Lp(a) observée chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (Alonso et al., 2014) ne s'explique probablement pas par un défaut de catabolisme impliquant le LDLR. Notre groupe a par ailleurs publié plusieurs études ne montrant aucun effet du LDLR sur le catabolisme de la Lp(a) (Croyal et al., 2018; Villard et al., 2016). Nous avons récemment confirmé ces résultats en investiguant la capture de la Lp(a) par le foie de souris humanisées et dans des lymphocytes humains en culture primaire, après avoir augmenté l'expression du LDLR *via* un traitement par l'alirocumab. Alors que la capture des LDL par le foie des souris transgéniques et par les lymphocytes était fortement augmentée après l'injection

de l'alirocumab, aucun effet n'a été observé sur la capture de la Lp(a), ni par le foie des souris humanisées, ni dans les lymphocytes humains en culture primaire (Chemello et al., 2020). Nous ne pensons pas que le LDLR soit une voie d'épuration plasmatique de la Lp(a) mais il n'est pas exclu que lorsqu'il est très fortement exprimé lors d'un traitement combinant une statine et un inhibiteur de PCSK9, il puisse contribuer à la capture de la Lp(a) circulante (Pirillo and Catapano, 2018; Watts et al., 2018).

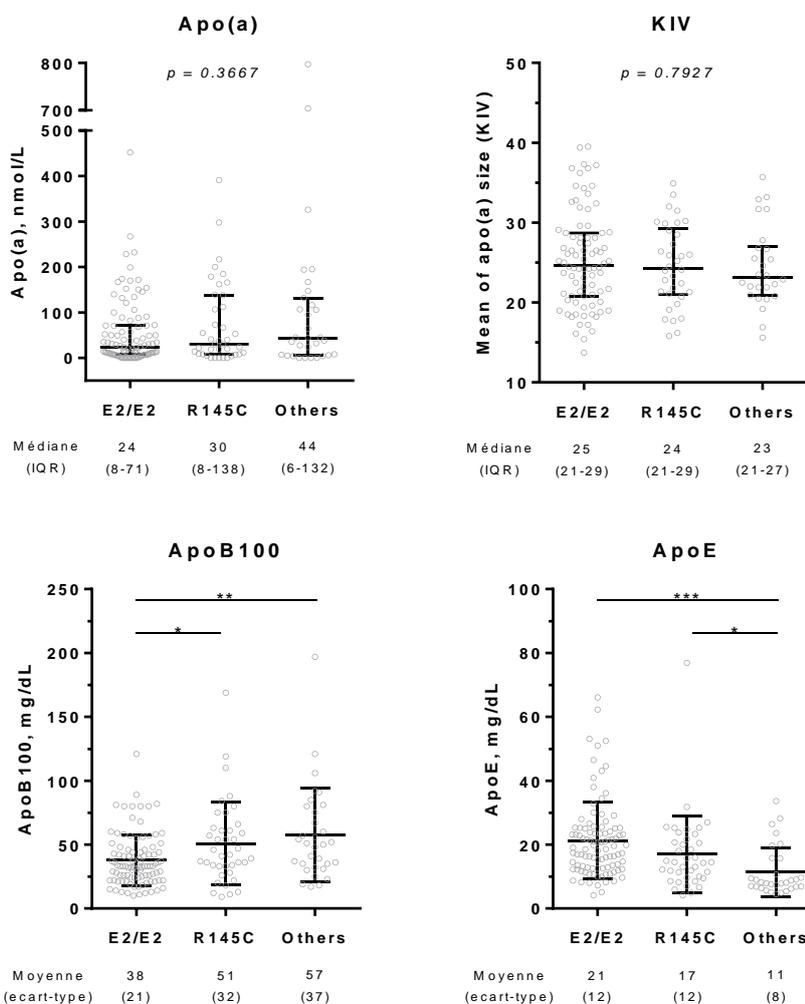
### **Etude de la Lp(a) dans la dysbêtalipoprotéïnémie induite par des mutations de l'apoE –**

Les individus porteurs du phénotype E2/E2 présentent des taux de Lp(a) et un risque cardiovasculaire réduits par rapport aux autres phénotypes apoE (Kritharides et al., 2017; Moriarty et al., 2017). Environ 10% des individus E2/E2 développent entre 30 et 40 ans une dysbêtalipoprotéïnémie. Cette pathologie se caractérise par des concentrations très basses en LDL cholestérol du fait d'une mauvaise conversion des VLDL en IDL puis des IDL en LDL. En plus de l'homozygotie à apoE2, d'autres mutations naturelles de l'apoE sont associées à une transmission autosomique dominante de la dysbêtalipoprotéïnémie, souvent de forme plus sévère, telles que les mutations R142C (Arg160Cys), R145C (Arg163Cys), K146Q (Lys164Gln) et L149del (Marais, 2019).

Nous avons récemment initié une nouvelle étude en collaboration avec le Dr Blom et le Dr Marais (Le Cap, Afrique du Sud) dans le but d'étudier la Lp(a) dans un environnement dyslipidémique particulier, celui de la dysbêtalipoprotéïnémie. Notre hypothèse de recherche est que cette pathologie pourrait induire une réduction des niveaux de Lp(a) par rapport aux patients non atteints également porteurs du phénotype E2/E2. Par ailleurs, comme les patients atteints de dysbêtalipoprotéïnémie présentent très peu de particules de LDL, nous souhaitons vérifier si l'apo(a) peut circuler sous forme libre (non liée) ou en association avec d'autres lipoprotéines à apoB100 comme les VLDL ou les IDL. Dans cette étude, 169 patients non traités atteints de dysbêtalipoprotéïnémie ont été sélectionnés incluant 99 patients porteurs du phénotype E2/E2, 39 patients porteurs de la mutation R145C de l'apoE et 31 patients ayant développé une dysbêtalipoprotéïnémie pour des raisons inconnues.

Le nombre moyen de KIV de l'apo(a) et les concentrations en apo(a), apoB100 et apoE ont été déterminés par spectrométrie de masse. Nous avons tout d'abord observé que les taux médians de Lp(a) étaient normaux chez ces patients (30 nmol/L, ~12 mg/dL) comparativement à ceux observés dans population générale (25 nmol/L, ~10 mg/dL). La stratification des patients en fonction du facteur génétique à l'origine de la dysbêtalipoprotéïnémie (E2/E2, R145C, cause

inconnue), n'a montré aucune différence significative entre les groupes sur les niveaux d'apo(a), ni sur sa taille moyenne (**Figure ci-après**). En revanche, les concentrations d'apoB100 étaient plus basses chez les patients E2/E2 comparativement aux patients porteurs de la mutation R145C et aux autres patients. Au contraire, les concentrations d'apoE étaient plus hautes chez les patients E2/E2 par rapport autres patients.



***Effet de mutations de l'apoE associées à une dysbétalipoprotéïnémie sur les concentrations et la taille de l'apo(a) ainsi que sur les concentrations en apoB100 et en apoE.***

Test statistique : Kruskal-Wallis. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Les prochains travaux expérimentaux consisteront à (1) déterminer la taille exacte de l'apo(a) par Western Blot sur gel d'agarose, (2) étudier le profil lipoprotéique de ces patients par FPLC afin d'estimer la taille de la Lp(a) potentiellement présente dans le plasma de ces patients et (3) d'isoler l'apo(a) par immunoprécipitation pour savoir si celle-ci circule librement ou si elle est associée à une lipoprotéine à apoB100. Des patients E2/E2 sains seront sélectionnés dans les cohortes dont nous disposons pour servir de groupe contrôle.

## ***Effets des inhibiteurs de PCSK9 et de l'aphérèse sur la Lp(a)***

**La réduction de la Lp(a) par les inhibiteurs de PCSK9 est influencée par la taille de l'apo(a)** – Les inhibiteurs de PCSK9 induisent une réduction de 25 à 30% des niveaux de Lp(a) parallèlement à une réduction de 50 à 60% du LDL cholestérol (Lambert et al., 2017). Comme l'inhibition de PCSK9 entraîne une augmentation de l'expression du LDLR à la surface des cellules, beaucoup de spécialistes suggèrent que dans ces conditions, la Lp(a) est catabolisée par ce récepteur. Cependant, la corrélation entre les variations de LDL cholestérol et celles de la Lp(a) induites par les inhibiteurs de PCSK9 sont faibles et la réduction de la Lp(a) est très variable selon les individus (Mahmood et al., 2020; Shapiro et al., 2019; Thedrez et al., 2018). D'après plusieurs études récentes, *LPA*, *APOE* et *PCSK9* sont les seuls gènes identifiés présentant une association significative avec les niveaux de Lp(a) circulants (Erhart et al., 2018; Langsted et al., 2016; Mack et al., 2017). Par conséquent, la modulation des niveaux de Lp(a) induite par les inhibiteurs de PCSK9 pourrait être affectée de manière variable en fonction des polymorphismes de l'apo(a) et de l'apoE.

Nos travaux étudiant l'effet des inhibiteurs de PCSK9 sur les niveaux de Lp(a) ont confirmé la forte discordance et l'absence de corrélation entre les changements des niveaux de Lp(a) et de lipoprotéines à apoB100 (VLDL, IDL et LDL) induits par les inhibiteurs de PCSK9, indiquant donc que, contrairement aux VLDL, aux IDL et aux LDL, la Lp(a) n'emprunte pas la voie du LDLR pour être dégradée (Blanchard et al., 2020. Soumis).

Nous n'avons pas observé d'effet significatif des isoformes de l'apoE sur le pourcentage de réduction de la Lp(a) après ajustement sur les concentrations de base de Lp(a). Le manque de puissance statistique lié au faible nombre de patients porteurs des isoformes apoE2 et apoE4 pourrait expliquer cette absence d'association significative, en particulier pour l'apoE2 dont la présence est associée à une diminution relative de Lp(a) plus importante par rapport à l'isoforme apoE3 sans ajustement statistique, mais cet effet disparaît après ajustement par rapport aux niveaux de Lp(a) à l'inclusion. Il semble que l'effet des isoformes de l'apoE sur la diminution de la Lp(a) induite par l'inhibition de PCSK9 passe par leurs effets sur les concentrations plasmatiques de Lp(a).

Nous avons également démontré, pour la première fois, que la taille de l'apo(a) module l'efficacité des inhibiteurs de PCSK9 pour réduire les concentrations plasmatiques de Lp(a). En effet, plus l'apo(a) est longue, plus sa réduction relative induite par l'évolocumab ou

l'alirocumab est importante. Nous avons calculé que pour chaque domaine KIV<sub>2</sub> en plus sur l'apo(a) on obtient une réduction supplémentaire de 3% des concentrations en Lp(a) suite à un traitement par inhibiteur de PCSK9. Ce résultat original apporte de nouveaux éclairages quant à la grande variabilité de réponse dans la réduction de la Lp(a) induite par les inhibiteurs de PCSK9. Néanmoins, le polymorphisme de taille de l'apo(a) ne semble pas être le seul facteur à l'origine de cette grande variabilité car deux individus de même phénotype ne répondront probablement pas de manière similaire en termes de réduction de la Lp(a) par inhibition de PCSK9. Des résultats relativement similaires ont été observés dans une étude explorant l'effet de la niacine sur les concentrations plasmatiques de la Lp(a) (Parish et al., 2018). La réduction relative des grandes isoformes d'apo(a) était significativement plus importante que celle des petites isoformes. Les mécanismes à l'origine de nos observations ne sont aujourd'hui pas connus et nécessiteraient des investigations supplémentaires. Le groupe de Watts a suggéré qu'un traitement combinant l'alirocumab ou l'evolocumab avec des statines pourrait réduire les concentrations de Lp(a) en accélérant sa vitesse de catabolisme *via* le LDLR (Watts et al., 2020, 2018). Cependant, dans notre étude, nous avons montré que les diminutions relatives et absolues de Lp(a) n'étaient pas corrélées avec celles des autres lipoprotéines à apoB100, ce qui suggère à nouveau que le LDLR n'est pas ou très peu impliqué dans le catabolisme de la Lp(a). Nous pensons au contraire que l'effet des inhibiteurs de PCSK9 sur la Lp(a) a lieu au niveau de sa production car les concentrations plasmatiques de Lp(a) dépendent essentiellement de la vitesse de synthèse d'apo(a). Notre groupe a également montré sur des hépatocytes primaires humains que la sécrétion d'apo(a) ou de Lp(a) était accélérée par PCSK9 et inhibée après l'ajout de l'alirocumab (Villard et al., 2016). Ainsi, les inhibiteurs de PCSK9 pourraient ralentir la production ou la sécrétion des isoformes d'apo(a) en ciblant préférentiellement les grandes isoformes naturellement plus difficiles et plus longues à synthétiser. Une méthode de traçage *in vitro* par immunocytochimie sur des cellules exprimant des isoformes d'apo(a) de tailles différentes permettrait probablement de valider cette hypothèse.

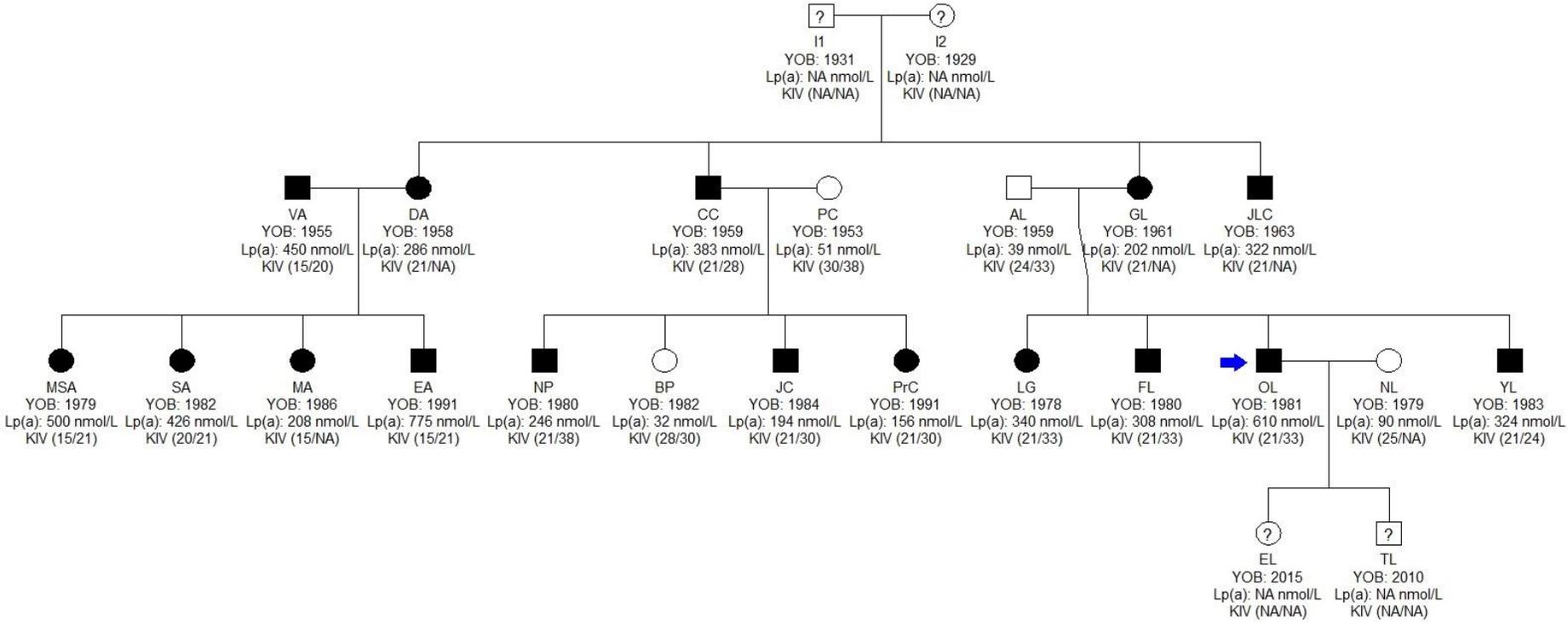
**L'aphérèse est le seul traitement pour traiter efficacement l'hyper-Lp(a)** – Bien que les inhibiteurs de PCSK9 diminuent significativement les niveaux de Lp(a), leur efficacité est généralement insuffisante pour atteindre le seuil de risque établi à 30 mg/dL (~75 nmol/L) (Vuorio et al., 2017). Aujourd'hui, l'aphérèse reste la seule approche thérapeutique disponible pour traiter efficacement les patients atteints d'hyper-Lp(a).

Nous avons rapporté le cas d'un patient réunionnais ayant fait plusieurs infarctus du myocarde avant 33 ans, présentant des taux de Lp(a) extrêmement élevés (244 mg/dL, ~610 nmol/L) et

une mutation pro-athérogène de la prothrombine. Nous avons confirmé que l'aphérèse réduisait drastiquement les taux de Lp(a) et le risque de récurrence cardiovasculaire chez ce sujet ([Khantalin et al., 2019](#)). Il convient de noter que ce patient a été traité par aphérèse filtrante, qui permet de diminuer la Lp(a) mais de manière non spécifique. En effet, toutes les autres lipoprotéines à apoB100 ont également été éliminées dans ces conditions.

Nous avons récemment acquis une banque de plasmas de 33 patients atteints d'hyper-Lp(a) et traités par une technique d'aphérèse basée sur l'immuno-capture de l'apo(a). Ce projet, en collaboration avec le Dr Steinhagen-Thiessen et le Dr Kassner (Berlin, Allemagne), vise à étudier l'influence de plusieurs facteurs dont le polymorphisme de taille de l'apo(a) sur la réduction de la Lp(a) induite par ce type d'aphérèse. A noter cependant que ce type d'intervention reste très invasif pour le patient. L'avenir réside très certainement dans le développement et la mise sur le marché de médicaments.

**Etude de l'hyper-Lp(a) dans une famille réunionnaise** – Le jeune patient présenté ci-dessus fait l'objet de nombreuses investigations en collaboration avec le Dr Coassin (Innsbruck, Autriche) et le Pr Cariou (Nantes, France). Comme l'hyper-Lp(a) est un facteur de risque cardiovasculaire héréditaire majeur, nous étudions actuellement la transmission génétique des allèles de *LPA* au sein de la famille de ce patient. L'inclusion d'autant de membres d'une même famille au génotype rare est une chance considérable pour apporter de nouveaux éléments dans la compréhension du métabolisme de la Lp(a) et de sa physiopathologie. Nos premiers résultats ont confirmé la transmission autosomique dominante de l'hyper-Lp(a) dans cette famille. En effet, les taux élevés de Lp(a) du patient traité par aphérèse (OL) s'explique par la présence d'une isoforme d'apo(a) surexprimée de 21 KIV. Nous avons confirmé par Western Blot et par séquençage du gène *LPA* que cette isoforme était présente chez 14 des 20 membres de cette famille. Tous les individus porteurs de cette isoforme présentent des taux de Lp(a) supérieurs à 150 nmol/L (~60 mg/dL) et 5 d'entre eux ont déjà été victimes d'événements cardiovasculaires prématurés (**Figure ci-après**). Les investigations ultérieures consisteront notamment à identifier les SNPs associés aux taux élevés de Lp(a) et à étudier la capture et la production de Lp(a) sur des hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes générées à partir de prélèvements des membres de cette famille.



**Etude des niveaux élevés de Lp(a) dans une famille réunionnaise.**

Les ronds et les carrés indiquent respectivement les femmes et les hommes. Les carrés et les ronds noirs indiquent les membres avec des taux de Lp(a) supérieurs à 150 nmol/L (~60 mg/dL). Les carrés et les ronds blancs indiquent les membres avec des taux de Lp(a) inférieurs à 100 nmol/L (~40 mg/dL). La flèche bleu indique le propositus.

# Conclusion générale

Des niveaux élevés de Lp(a) constituent l'un des plus importants facteurs de risque génétique pour la survenue d'une maladie cardiovasculaire. Cette lipoprotéine reste pourtant encore aujourd'hui très énigmatique car elle est difficile à étudier en raison de son métabolisme complexe et de la variabilité polymorphique extrême de sa protéine signature, l'apo(a).

Mes travaux de thèse ont permis de développer des techniques et des approches originales pour apporter de nouvelles connaissances sur la Lp(a). La LC-MS/MS a été l'outil central de cette thèse en permettant l'analyse quantitative et l'étude cinétique de l'apo(a) et d'autres apolipoprotéines partenaires fortement impliquées dans le métabolisme lipoprotéique. Le développement d'une méthode par Western Blot permettant de déterminer la taille exacte des isoformes d'apo(a) a aussi amélioré considérablement la qualité de nos investigations. Grâce à ces techniques, nous avons pu étudier la Lp(a) par différentes approches. L'étude de cohortes de patients atteints de dyslipidémies bien définies ou traités par différentes thérapies hypolipémiantes nous a permis de valider ou d'infirmer nos hypothèses de recherche concernant le rôle du LDLR, de l'apoE et de PCSK9 dans la régulation des niveaux de Lp(a).

Notre groupe a également réalisé plusieurs études mécanistiques en testant deux modèles animaux (souris, macaque) mais dont la pertinence des résultats obtenus demeure limitée puisque la souris ne produit pas d'apo(a) et que le gène *LPA* des macaques est assez différent de celui de l'Homme. Néanmoins, la production d'hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes générées à partir de membres de la famille réunionnaise présentant une hyper-Lp(a), apportera certainement des données informatives intéressantes concernant le métabolisme si particulier de la Lp(a). Par ailleurs, des études cinétiques mieux conçues pour répondre à nos hypothèses de recherche (phénotypes particuliers par exemple) et réalisées sur des patients présentant des taux élevés de Lp(a) permettraient d'aborder de nombreuses problématiques sur les flux métaboliques de la Lp(a).

D'un point de vue clinique, les inhibiteurs de PCSK9 et l'aphérèse sont les seules thérapies capables de réduire les taux de Lp(a). Cependant, les inhibiteurs de PCSK9 ne sont pas assez efficaces et le traitement par aphérèse comporte de nombreux inconvénients (coût élevé, traitement invasif). L'avenir concernant le traitement de l'hyper-Lp(a) repose très certainement sur les nouveaux oligonucléotides antisens capables d'inhiber spécifiquement l'expression du gène *LPA*. Ces médicaments sont actuellement en cours d'essais cliniques et pourraient considérablement améliorer la prise en charge des patients atteints d'hyper-Lp(a).

# **REFERENCES**

## A

- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., et al. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* *34*, 154–156.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* *271*, 518–520.
- Afshar, M., Kamstrup, P.R., Williams, K., Sniderman, A.D., Nordestgaard, B.G., and Thanassoulis, G. (2016). Estimating the Population Impact of Lp(a) Lowering on the Incidence of Myocardial Infarction and Aortic Stenosis-Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *36*, 2421–2423.
- AIM-HIGH Investigators, Boden, W.E., Probstfield, J.L., Anderson, T., Chaitman, B.R., Desvignes-Nickens, P., Koprowicz, K., McBride, R., Teo, K., and Weintraub, W. (2011). Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2255–2267.
- Ait-Oufella, H., Sage, A.P., Mallat, Z., and Tedgui, A. (2014). Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ. Res.* *114*, 1640–1660.
- Akioyamen, L.E., Genest, J., Shan, S.D., Reel, R.L., Albaum, J.M., Chu, A., and Tu, J.V. (2017). Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* *7*, e016461.
- Albers, J.J., Adolphson, J.L., and Hazzard, W.R. (1977). Radioimmunoassay of human plasma Lp(a) lipoprotein. *J. Lipid Res.* *18*, 331–338.
- Albers, J.J., Kennedy, H., and Marcovina, S.M. (1996). Evidence that Lp[a] contains one molecule of apo[a] and one molecule of apoB: evaluation of amino acid analysis data. *J. Lipid Res.* *37*, 192–196.
- Albers, J.J., Slee, A., O'Brien, K.D., Robinson, J.G., Kashyap, M.L., Kwiterovich, P.O., Xu, P., and Marcovina, S.M. (2013). Relationship of apolipoproteins A-1 and B, and lipoprotein(a) to cardiovascular outcomes: the AIM-HIGH trial (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglyceride and Impact on Global Health Outcomes). *J. Am. Coll. Cardiol.* *62*, 1575–1579.
- Alessandri, C., Basili, S., Maurelli, M., Andreozzi, P., Violi, F., and Cordova, C. (1994). Relationship between lipoprotein(a) levels in serum and some indices of protein synthesis in liver cirrhosis. *Clin. Chim. Acta* *224*, 125–129.
- Alexander, M.R., and Owens, G.K. (2012). Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu. Rev. Physiol.* *74*, 13–40.

- Ali, S., Bunker, C.H., Aston, C.E., Ukoli, F.A., and Kamboh, M.I. (1998). Apolipoprotein A kringle 4 polymorphism and serum lipoprotein (a) concentrations in African blacks. *Hum. Biol.* *70*, 477–490.
- Allahverdian, S., Chehroudi, A.C., McManus, B.M., Abraham, T., and Francis, G.A. (2014). Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation* *129*, 1551–1559.
- Allen, S., Khan, S., Tam, S. p, Koschinsky, M., Taylor, P., and Yacoub, M. (1998). Expression of adhesion molecules by lp(a): a potential novel mechanism for its atherogenicity. *FASEB J.* *12*, 1765–1776.
- Alonso, R., Andres, E., Mata, N., Fuentes-Jiménez, F., Badimón, L., López-Miranda, J., Padró, T., Muñoz, O., Díaz-Díaz, J.L., Mauri, M., et al. (2014). Lipoprotein(a) levels in familial hypercholesterolemia: an important predictor of cardiovascular disease independent of the type of LDL receptor mutation. *J. Am. Coll. Cardiol.* *63*, 1982–1989.
- Anuurad, E., Lu, G., Rubin, J., Pearson, T.A., and Berglund, L. (2007). ApoE genotype affects allele-specific apo[a] levels for large apo[a] sizes in African Americans: the Harlem-Basset Study. *J. Lipid Res.* *48*, 693–698.
- Anuurad, E., Rubin, J., Chiem, A., Tracy, R.P., Pearson, T.A., and Berglund, L. (2008). High levels of inflammatory biomarkers are associated with increased allele-specific apolipoprotein(a) levels in African-Americans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 1482–1488.
- Arai, K., Orsoni, A., Mallat, Z., Tedgui, A., Witztum, J.L., Bruckert, E., Tselepis, A.D., Chapman, M.J., and Tsimikas, S. (2012). Acute impact of apheresis on oxidized phospholipids in patients with familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* *53*, 1670–1678.
- Armitage, J., Holmes, M.V., and Preiss, D. (2019). Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition for Preventing Cardiovascular Events: JACC Review Topic of the Week. *J. Am. Coll. Cardiol.* *73*, 477–487.
- Arsenault, B.J., Boekholdt, S.M., Dubé, M.-P., Rhéaume, E., Wareham, N.J., Khaw, K.-T., Sandhu, M.S., and Tardif, J.-C. (2014). Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet* *7*, 304–310.
- Arsenault, B.J., Petrides, F., Tabet, F., Bao, W., Hovingh, G.K., Boekholdt, S.M., Ramin-Mangata, S., Meilhac, O., DeMicco, D., Rye, K.-A., et al. (2018). Effect of atorvastatin, cholesterol ester transfer protein inhibition, and diabetes mellitus on circulating proprotein subtilisin kexin type 9 and lipoprotein(a) levels in patients at high cardiovascular risk. *J Clin Lipidol* *12*, 130–136.
- Austin, M.A., Sandholzer, C., Selby, J.V., Newman, B., Krauss, R.M., and Utermann, G. (1992). Lipoprotein(a) in women twins: heritability and relationship to apolipoprotein(a) phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* *51*, 829–840.

- Awad, K., Mikhailidis, D.P., Katsiki, N., Muntner, P., Banach, M., and Lipid and Blood Pressure Meta-Analysis Collaboration (LBPMC) Group (2018). Effect of Ezetimibe Monotherapy on Plasma Lipoprotein(a) Concentrations in Patients with Primary Hypercholesterolemia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Drugs* 78, 453–462.

## B

- Bach-Ngohou, K., Giraud, F., Krempf, M., and Bard, J.M. (2001). Influence of remnant accumulation markers on plasma concentrations of two lipoprotein(a) subspecies (containing or free of apoE). *Metab. Clin. Exp.* 50, 277–282.
- Bard, J.M., Delattre-Lestavel, S., Clavey, V., Pont, P., Derudas, B., Parra, H.J., and Fruchart, J.C. (1992). Isolation and characterization of two sub-species of Lp(a), one containing apo E and one free of apo E. *Biochim. Biophys. Acta* 1127, 124–130.
- Barre, E. (2003). A more detailed fatty acid composition of human lipoprotein(a)--a comparison with low density lipoprotein. *Chem. Phys. Lipids* 123, 99–105.
- Barrett, P.H.R., Chan, D.C., and Watts, G.F. (2006). Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J. Lipid Res.* 47, 1607–1619.
- Barter, P.J., and Rye, K.-A. (2012). Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *J. Lipid Res.* 53, 1755–1766.
- Barter, P.J., Hopkins, G.J., and Calvert, G.D. (1982). Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem. J.* 208, 1–7.
- Becker, L., Cook, P.M., and Koschinsky, M.L. (2004). Identification of sequences in apolipoprotein(a) that maintain its closed conformation: a novel role for apo(a) isoform size in determining the efficiency of covalent Lp(a) formation. *Biochemistry* 43, 9978–9988.
- Becker, L., Nesheim, M.E., and Koschinsky, M.L. (2006). Catalysis of covalent Lp(a) assembly: evidence for an extracellular enzyme activity that enhances disulfide bond formation. *Biochemistry* 45, 9919–9928.
- de Beer, F., Stalenhoef, A.F.H., Hoogerbrugge, N., Kastelein, J.J.P., Gevers Leuven, J.A., van Duijn, C.M., Havekes, L.M., and Smelt, A.H.M. (2002). Expression of type III hyperlipoproteinemia in apolipoprotein E2 (Arg158 --> Cys) homozygotes is associated with hyperinsulinemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 294–299.
- Benn, M., Watts, G.F., Tybjærg-Hansen, A., and Nordestgaard, B.G. (2016). Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur. Heart J.* 37, 1384–1394.

- Bennet, A.M., Di Angelantonio, E., Ye, Z., Wensley, F., Dahlin, A., Ahlbom, A., Keavney, B., Collins, R., Wiman, B., de Faire, U., et al. (2007). Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA* 298, 1300–1311.
- Berg, K. (1963). A NEW SERUM TYPE SYSTEM IN MAN--THE LP SYSTEM. *Acta Pathol Microbiol Scand* 59, 369–382.
- Berg, K., and Mohr, J. (1963). GENETICS OF THE LP SYSTEM. *Acta Genet Stat Med* 13, 349–360.
- Berg, K., Dahlén, G., and Frick, M.H. (1974). Lp(a) lipoprotein and pre-beta1-lipoprotein in patients with coronary heart disease. *Clin. Genet.* 6, 230–235.
- Bergmark, B.A., O’Donoghue, M.L., Murphy, S.A., Kuder, J.F., Ezhov, M.V., Ceška, R., Gouni-Berthold, I., Jensen, H.K., Tokgozoglou, S.L., Mach, F., et al. (2020). An Exploratory Analysis of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibition and Aortic Stenosis in the FOURIER Trial. *JAMA Cardiol.*
- Bergmark, C., Dewan, A., Orsoni, A., Merki, E., Miller, E.R., Shin, M.-J., Binder, C.J., Hörkkö, S., Krauss, R.M., Chapman, M.J., et al. (2008). A novel function of lipoprotein [a] as a preferential carrier of oxidized phospholipids in human plasma. *J. Lipid Res.* 49, 2230–2239.
- Beynon, R.J., Doherty, M.K., Pratt, J.M., and Gaskell, S.J. (2005). Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat. Methods* 2, 587–589.
- Binder, C.J., Papac-Milicevic, N., and Witztum, J.L. (2016). Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 485–497.
- Blanchard, V., Ramin-Mangata, S., Billon-Crossouard, S., Aguesse, A., Durand, M., Chemello, K., Nativel, B., Flet, L., Chétiveaux, M., Jacobi, D., et al. (2018). Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study. *J. Lipid Res.* 59, 892–900.
- Blanchard, V., Croyal, M., Khantaline, I., Ramin-Mangata, S., Chemello, K., Nativel, B., Blom, D.J., Marais, A.D., and Lambert, G. (2019). Reduced Lipoprotein(a) Associated With the Apolipoprotein E2 Genotype Confers Cardiovascular Protection in Familial Hypercholesterolemia. *JACC Basic Transl Sci* 4, 425–427.
- Blanchard, V., Garçon, D., Jaunet, C., Chemello, K., Billon-Crossouard, S., Aguesse, A., Garfa, A., Famchon, G., Torres, A., May, C.L., et al. (2020). A high-throughput mass spectrometry–based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins. *J. Lipid Res.* jlr.D120000835.
- Boffa, M.B., and Koschinsky, M.L. (2019). Oxidized phospholipids as a unifying theory for lipoprotein(a) and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 16, 305–318.

- Bonen, D.K., Hausman, A.M., Hadjiagapiou, C., Skarosi, S.F., and Davidson, N.O. (1997). Expression of a recombinant apolipoprotein(a) in HepG2 cells. Evidence for intracellular assembly of lipoprotein(a). *J. Biol. Chem.* 272, 5659–5667.
- Boomsma, D.I., Knijff, P., Kaptein, A., Labeur, C., Martin, N.G., Havekes, L.M., and Princen, H.M. (2000). The effect of apolipoprotein(a)-, apolipoprotein E-, and apolipoprotein A4- polymorphisms on quantitative lipoprotein(a) concentrations. *Twin Res* 3, 152–158.
- Boonmark, N.W., Lou, X.J., Yang, Z.J., Schwartz, K., Zhang, J.L., Rubin, E.M., and Lawn, R.M. (1997). Modification of apolipoprotein(a) lysine binding site reduces atherosclerosis in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 100, 558–564.
- Bopp, S., Köchl, S., Acquati, F., Magnaghi, P., Pethö-Schramm, A., Kraft, H.G., Utermann, G., Müller, H.J., and Taramelli, R. (1995). Ten allelic apolipoprotein[a] 5' flanking fragments exhibit comparable promoter activities in HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 36, 1721–1728.
- Bouchareb, R., Mahmut, A., Nsaibia, M.J., Boulanger, M.-C., Dahou, A., Lépine, J.-L., Laflamme, M.-H., Hadji, F., Couture, C., Trahan, S., et al. (2015). Autotaxin Derived From Lipoprotein(a) and Valve Interstitial Cells Promotes Inflammation and Mineralization of the Aortic Valve. *Circulation* 132, 677–690.
- Brewer, H.B. (1981). Current concepts of the molecular structure and metabolism of human apolipoproteins and lipoproteins. *Klin. Wochenschr.* 59, 1023–1035.
- van den Broek, I., Romijn, F.P.H.T.M., Nouta, J., van der Laarse, A., Drijfhout, J.W., Smit, N.P.M., van der Burgt, Y.E.M., and Cobbaert, C.M. (2016). Automated Multiplex LC-MS/MS Assay for Quantifying Serum Apolipoproteins A-I, B, C-I, C-II, C-III, and E with Qualitative Apolipoprotein E Phenotyping. *Clin. Chem.* 62, 188–197.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34–47.
- Brown, W.V., Ballantyne, C.M., Jones, P.H., and Marcovina, S. (2010). Management of Lp(a). *J Clin Lipidol* 4, 240–247.
- Brunner, C., Lobentanz, E.M., Pethö-Schramm, A., Ernst, A., Kang, C., Dieplinger, H., Müller, H.J., and Utermann, G. (1996). The number of identical kringle IV repeats in apolipoprotein(a) affects its processing and secretion by HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 32403–32410.
- Buré, C. (2005). Fragmentation dans une source à électronebulisation de biomolécules de synthèse : peptides thioester, acétal, aldéhyde et oligonucléotides bromés. thesis. Orléans.
- Burgess, S., Ference, B.A., Staley, J.R., Freitag, D.F., Mason, A.M., Nielsen, S.F., Willeit, P., Young, R., Surendran, P., Karthikeyan, S., et al. (2018). Association of LPA

Variants With Risk of Coronary Disease and the Implications for Lipoprotein(a)-Lowering Therapies: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Cardiol* 3, 619–627.

## C

- Cain, W.J., Millar, J.S., Himebauch, A.S., Tietge, U.J.F., Maugeais, C., Usher, D., and Rader, D.J. (2005). Lipoprotein [a] is cleared from the plasma primarily by the liver in a process mediated by apolipoprotein [a]. *J. Lipid Res.* 46, 2681–2691.
- Canoui-Poitrine, F., Luc, G., Bard, J.-M., Ferrieres, J., Yarnell, J., Arveiler, D., Morange, P., Kee, F., Evans, A., Amouyel, P., et al. (2010). Relative contribution of lipids and apolipoproteins to incident coronary heart disease and ischemic stroke: the PRIME Study. *Cerebrovasc. Dis.* 30, 252–259.
- Cao, Y.-X., Liu, H.-H., Dong, Q.-T., Li, S., and Li, J.-J. (2018). Effect of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) monoclonal antibodies on new-onset diabetes mellitus and glucose metabolism: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab* 20, 1391–1398.
- Capoulade, R., Chan, K.L., Yeang, C., Mathieu, P., Bossé, Y., Dumesnil, J.G., Tam, J.W., Teo, K.K., Mahmut, A., Yang, X., et al. (2015). Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 1236–1246.
- Capoulade, R., Torzewski, M., Mayr, M., Chan, K.-L., Mathieu, P., Bossé, Y., Dumesnil, J.G., Tam, J., Teo, K.K., Burnap, S.A., et al. (2020). ApoCIII-Lp(a) complexes in conjunction with Lp(a)-OxPL predict rapid progression of aortic stenosis. *Heart*.
- Carvalho, M.D.T., Harada, L.M., Gidlund, M., Ketelhuth, D.F.J., Boschcov, P., and Quintão, E.C.R. (2002). Macrophages take up triacylglycerol-rich emulsions at a faster rate upon co-incubation with native and modified LDL: An investigation on the role of natural chylomicrons in atherosclerosis. *J. Cell. Biochem.* 84, 309–323.
- Chajek, T., and Fielding, C.J. (1978). Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3445–3449.
- Chakraborty, B., Vishnoi, G., Goswami, B., Gowda, S.H., Chowdhury, D., and Agarwal, S. (2013). Lipoprotein(a), ferritin, and albumin in acute phase reaction predicts severity and mortality of acute ischemic stroke in North Indian Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22, e159-167.
- Chan, D.C., Watts, G.F., Coll, B., Wasserman, S.M., Marcovina, S.M., and Barrett, P.H.R. (2019). Lipoprotein(a) Particle Production as a Determinant of Plasma Lipoprotein(a) Concentration Across Varying Apolipoprotein(a) Isoform Sizes and Background Cholesterol-Lowering Therapy. *J Am Heart Assoc* 8, e011781.

- Chemello, K., Beeské, S., Tran, T.T.T., Blanchard, V., Villard, E.F., Poirier, B., Bail, J.-C.L., Dargazanli, G., Ho-Van-Guimbal, S., Boulay, D., et al. (2020). Lipoprotein(a) Cellular Uptake Ex Vivo and Hepatic Capture In Vivo Is Insensitive to PCSK9 Inhibition With Alirocumab. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science*.
- Chen, Y., Zhan, X., Zhao, Q., Wei, X., Xiao, J., Yan, C., and Zhang, W. (2019). Serum lipoprotein(a) and risk of hemorrhagic stroke among incident peritoneal dialysis patients: a large study from a single center in China. *Ren Fail* 41, 800–807.
- Chennamsetty, I., Claudel, T., Kostner, K.M., Baghdasaryan, A., Kratky, D., Levak-Frank, S., Frank, S., Gonzalez, F.J., Trauner, M., and Kostner, G.M. (2011). Farnesoid X receptor represses hepatic human APOA gene expression. *J. Clin. Invest.* 121, 3724–3734.
- Chennamsetty, I., Claudel, T., Kostner, K.M., Trauner, M., and Kostner, G.M. (2012a). FGF19 signaling cascade suppresses APOA gene expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1220–1227.
- Chennamsetty, I., Kostner, K.M., Claudel, T., Vinod, M., Frank, S., Weiss, T.S., Trauner, M., and Kostner, G.M. (2012b). Nicotinic acid inhibits hepatic APOA gene expression: studies in humans and in transgenic mice. *J. Lipid Res.* 53, 2405–2412.
- Chin, H.P., and Blankenhorn, D.H. (1968). Separation and quantitative analysis of serum lipoproteins by means of electrophoresis on cellulose acetate. *Clin. Chim. Acta* 20, 305–314.
- Cho, T., Jung, Y., and Koschinsky, M.L. (2008). Apolipoprotein(a), through its strong lysine-binding site in KIV(10<sup>3</sup>), mediates increased endothelial cell contraction and permeability via a Rho/Rho kinase/MYPT1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 283, 30503–30512.
- Cho, T., Romagnuolo, R., Scipione, C., Boffa, M.B., and Koschinsky, M.L. (2013). Apolipoprotein(a) stimulates nuclear translocation of  $\beta$ -catenin: a novel pathogenic mechanism for lipoprotein(a). *Mol. Biol. Cell* 24, 210–221.
- Choi, S.H., Chae, A., Miller, E., Messig, M., Ntanios, F., DeMaria, A.N., Nissen, S.E., Witztum, J.L., and Tsimikas, S. (2008). Relationship between biomarkers of oxidized low-density lipoprotein, statin therapy, quantitative coronary angiography, and atheroma: volume observations from the REVERSAL (Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 24–32.
- Chretien, J.-P., Coresh, J., Berthier-Schaad, Y., Kao, W.H.L., Fink, N.E., Klag, M.J., Marcovina, S.M., Giaculli, F., and Smith, M.W. (2006). Three single-nucleotide polymorphisms in LPA account for most of the increase in lipoprotein(a) level elevation in African Americans compared with European Americans. *J. Med. Genet.* 43, 917–923.
- Chuang, T.-Y., Chao, C.-L., Lin, B.J., and Lu, S.-C. (2009). Gestational hyperlipidemic pancreatitis caused by type III hyperlipoproteinemia with apolipoprotein E2/E2 homozygote. *Pancreas* 38, 716–717.

- Clarke, R., Peden, J.F., Hopewell, J.C., Kyriakou, T., Goel, A., Heath, S.C., Parish, S., Barlera, S., Franzosi, M.G., Rust, S., et al. (2009). Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2518–2528.
- Coassin, S., Erhart, G., Weissensteiner, H., Eca Guimarães de Araújo, M., Lamina, C., Schönherr, S., Forer, L., Haun, M., Losso, J.L., Köttgen, A., et al. (2017). A novel but frequent variant in LPA KIV-2 is associated with a pronounced Lp(a) and cardiovascular risk reduction. *Eur. Heart J.* *38*, 1823–1831.
- Cobbaert, C., and Kesteloot, H. (1992). Serum lipoprotein(a) levels in racially different populations. *Am. J. Epidemiol.* *136*, 441–449.
- Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I.K., Graham, R., Garcia, C.K., and Hobbs, H.H. (2005). Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* *37*, 161–165.
- Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H., and Hobbs, H.H. (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* *354*, 1264–1272.
- Cohn, J.S., Marcoux, C., and Davignon, J. (1999). Detection, quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *19*, 2474–2486.
- Craig, W.Y., Poulin, S.E., Forster, N.R., Neveux, L.M., Wald, N.J., and Ledue, T.B. (1992). Effect of sample storage on the assay of lipoprotein(a) by commercially available radial immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Clin. Chem.* *38*, 550–553.
- Croyal, M. (2017). Apports des évolutions de la spectrométrie de masse pour l'étude statique et dynamique du métabolisme des lipides et des lipoprotéines. thesis. Nantes.
- Croyal, M., Ouguerram, K., Passard, M., Ferchaud-Roucher, V., Chétiveaux, M., Billon-Crossouard, S., de Gouville, A.-C., Lambert, G., Krempf, M., and Nobécourt, E. (2015). Effects of Extended-Release Nicotinic Acid on Apolipoprotein (a) Kinetics in Hypertriglyceridemic Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *35*, 2042–2047.
- Croyal, M., Fall, F., Ferchaud-Roucher, V., Chétiveaux, M., Zair, Y., Ouguerram, K., Krempf, M., and Nobécourt, E. (2016). Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* *57*, 509–515.
- Croyal, M., Tran, T.-T.-T., Blanchard, R.H., Le Bail, J.-C., Villard, E.F., Poirier, B., Aguesse, A., Billon-Crossouard, S., Ramin-Mangata, S., Blanchard, V., et al. (2018). PCSK9 inhibition with alirocumab reduces lipoprotein(a) levels in nonhuman primates by lowering apolipoprotein(a) production rate. *Clin. Sci.* *132*, 1075–1083.
- Croyal, M., Blanchard, V., Ouguerram, K., Chétiveaux, M., Cabioch, L., Moyon, T., Billon-Crossouard, S., Aguesse, A., Bernardeau, K., Le May, C., et al. (2020). VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein)-Apo E (Apolipoprotein E) May Influence Lp(a)

- (Lipoprotein [a]) Synthesis or Assembly. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *40*, 819–829.
- Császár, A., Dieplinger, H., Sandholzer, C., Karádi, I., Juhász, E., Drexel, H., Halmos, T., Romics, L., Patsch, J.R., and Utermann, G. (1993). Plasma lipoprotein (a) concentration and phenotypes in diabetes mellitus. *Diabetologia* *36*, 47–51.
  - Cuchel, M., Meagher, E.A., du Toit Theron, H., Blom, D.J., Marais, A.D., Hegele, R.A., Averna, M.R., Sirtori, C.R., Shah, P.K., Gaudet, D., et al. (2013). Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet* *381*, 40–46.

## D

- Dati, F., Tate, J.R., Marcovina, S.M., Steinmetz, A., International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and IFCC Working Group for Lipoprotein(a) Assay Standardization (2004). First WHO/IFCC International Reference Reagent for Lipoprotein(a) for Immunoassay--Lp(a) SRM 2B. *Clin. Chem. Lab. Med.* *42*, 670–676.
- De Sain-Van Der Velden, M.G., Reijngoud, D.J., Kaysen, G.A., Gadellaa, M.M., Voorbij, H., Stellaard, F., Koomans, H.A., and Rabelink, T.J. (1998). Evidence for increased synthesis of lipoprotein(a) in the nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* *9*, 1474–1481.
- Deb, A., and Caplice, N.M. (2004). Lipoprotein(a): new insights into mechanisms of atherogenesis and thrombosis. *Clin Cardiol* *27*, 258–264.
- Demant, T., Seeberg, K., Bedynek, A., and Seidel, D. (2001). The metabolism of lipoprotein(a) and other apolipoprotein B-containing lipoproteins: a kinetic study in humans. *Atherosclerosis* *157*, 325–339.
- Deo, R.C., Wilson, J.G., Xing, C., Lawson, K., Kao, W.H.L., Reich, D., Tandon, A., Akylbekova, E., Patterson, N., Mosley, T.H., et al. (2011). Single-nucleotide polymorphisms in LPA explain most of the ancestry-specific variation in Lp(a) levels in African Americans. *PLoS ONE* *6*, e14581.
- Desai, N.R., Kohli, P., Giugliano, R.P., O'Donoghue, M.L., Somaratne, R., Zhou, J., Hoffman, E.B., Huang, F., Rogers, W.J., Wasserman, S.M., et al. (2013). AMG145, a monoclonal antibody against proprotein convertase subtilisin kexin type 9, significantly reduces lipoprotein(a) in hypercholesterolemic patients receiving statin therapy: an analysis from the LDL-C Assessment with Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Monoclonal Antibody Inhibition Combined with Statin Therapy (LAPLACE)-Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 57 trial. *Circulation* *128*, 962–969.
- Diffenderfer, M.R., Lamon-Fava, S., Marcovina, S.M., Barrett, P.H.R., Lel, J., Dolnikowski, G.G., Berglund, L., and Schaefer, E.J. (2016). Distinct metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein(a). *Metab. Clin. Exp.* *65*, 381–390.

- Dionyssiou-Asteriou, A., and Katimertzi, M. (1993). Endogenous testosterone and serum apolipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis* 100, 123–126.
- Djurovic, S., and Berg, K. (1997). Epidemiology of Lp(a) lipoprotein: its role in atherosclerotic/thrombotic disease. *Clin. Genet.* 52, 281–292.
- Dominiczak, M.H., and Caslake, M.J. (2011). Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann. Clin. Biochem.* 48, 498–515.
- Dong, L.M., Parkin, S., Trakhanov, S.D., Rupp, B., Simmons, T., Arnold, K.S., Newhouse, Y.M., Innerarity, T.L., and Weisgraber, K.H. (1996). Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia. *Nat. Struct. Biol.* 3, 718–722.
- Doucet, C., Huby, T., Chapman, J., and Thillet, J. (1994). Lipoprotein[a] in the chimpanzee: relationship of apo[a] phenotype to elevated plasma Lp[a] levels. *J. Lipid Res.* 35, 263–270.

## E

- Eaton, D.L., Fless, G.M., Kohr, W.J., McLean, J.W., Xu, Q.T., Miller, C.G., Lawn, R.M., and Scanu, A.M. (1987). Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3224–3228.
- Edelberg, J.M., Gonzalez-Gronow, M., and Pizzo, S.V. (1990). Lipoprotein(a) inhibition of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Thromb. Res.* 57, 155–162.
- Edelstein, C., Pfaffinger, D., Hinman, J., Miller, E., Lipkind, G., Tsimikas, S., Bergmark, C., Getz, G.S., Witztum, J.L., and Scanu, A.M. (2003). Lysine-phosphatidylcholine adducts in kringle V impart unique immunological and potential pro-inflammatory properties to human apolipoprotein(a). *J. Biol. Chem.* 278, 52841–52847.
- Edmiston, J.B., Brooks, N., Tavori, H., Minnier, J., Duell, B., Purnell, J.Q., Kaufman, T., Wojcik, C., Voros, S., Fazio, S., et al. (2017). Discordant response of low-density lipoprotein cholesterol and lipoprotein(a) levels to monoclonal antibodies targeting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *Journal of Clinical Lipidology* 11, 667–673.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498.
- Emdin, C.A., Khera, A.V., Natarajan, P., Klarin, D., Won, H.-H., Peloso, G.M., Stitzel, N.O., Nomura, A., Zekavat, S.M., Bick, A.G., et al. (2016). Phenotypic Characterization of Genetically Lowered Human Lipoprotein(a) Levels. *J. Am. Coll. Cardiol.* 68, 2761–2772.

- Emerging Risk Factors Collaboration, Erqou, S., Kaptoge, S., Perry, P.L., Di Angelantonio, E., Thompson, A., White, I.R., Marcovina, S.M., Collins, R., Thompson, S.G., et al. (2009). Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA* 302, 412–423.
- Enkhmaa, B., Anuurad, E., and Berglund, L. (2016). Lipoprotein (a): impact by ethnicity and environmental and medical conditions. *J. Lipid Res.* 57, 1111–1125.
- Enkhmaa, B., Anuurad, E., Zhang, W., Yue, K., Li, C.-S., and Berglund, L. (2017). The roles of apo(a) size, phenotype, and dominance pattern in PCSK9-inhibition-induced reduction in Lp(a) with alirocumab. *J. Lipid Res.* 58, 2008–2016.
- Erhart, G., Lamina, C., Lehtimäki, T., Marques-Vidal, P., Kähönen, M., Vollenweider, P., Raitakari, O.T., Waeber, G., Thorand, B., Strauch, K., et al. (2018). Genetic Factors Explain a Major Fraction of the 50% Lower Lipoprotein(a) Concentrations in Finns. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38, 1230–1241.
- Ernst, A., Helmhold, M., Brunner, C., Pethö-Schramm, A., Armstrong, V.W., and Müller, H.J. (1995). Identification of two functionally distinct lysine-binding sites in kringle 37 and in kringles 32-36 of human apolipoprotein(a). *J. Biol. Chem.* 270, 6227–6234.

## F

- Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Fless, G.M., Rolih, C.A., and Scanu, A.M. (1984). Heterogeneity of human plasma lipoprotein (a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. *J. Biol. Chem.* 259, 11470–11478.
- Fless, G.M., ZumMallen, M.E., and Scanu, A.M. (1986). Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a-) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein (a). *J. Biol. Chem.* 261, 8712–8718.
- Fletcher, G.F., Landolfo, C., Niebauer, J., Ozemek, C., Arena, R., and Lavie, C.J. (2018). Promoting Physical Activity and Exercise: JACC Health Promotion Series. *J. Am. Coll. Cardiol.* 72, 1622–1639.
- Frischmann, M.E., Ikewaki, K., Trenkwalder, E., Lamina, C., Dieplinger, B., Soufi, M., Schweer, H., Schaefer, J.R., König, P., Kronenberg, F., et al. (2012). In vivo stable-

isotope kinetic study suggests intracellular assembly of lipoprotein(a). *Atherosclerosis* 225, 322–327.

## G

- Gabel, B.R., May, L.F., Marcovina, S.M., and Koschinsky, M.L. (1996). Lipoprotein(a) assembly. Quantitative assessment of the role of apo(a) kringle IV types 2-10 in particle formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 1559–1567.
- Gansevoort, R.T., Heeg, J.E., Dikkeschei, F.D., de Zeeuw, D., de Jong, P.E., and Dullaart, R.P. (1994). Symptomatic antiproteinuric treatment decreases serum lipoprotein (a) concentration in patients with glomerular proteinuria. *Nephrol. Dial. Transplant.* 9, 244–250.
- Gaubatz, J.W., Chari, M.V., Nava, M.L., Guyton, J.R., and Morrisett, J.D. (1987). Isolation and characterization of the two major apoproteins in human lipoprotein [a]. *J. Lipid Res.* 28, 69–79.
- Gaudet, D., Kereiakes, D.J., McKenney, J.M., Roth, E.M., Hanotin, C., Gipe, D., Du, Y., Ferrand, A.-C., Ginsberg, H.N., and Stein, E.A. (2014). Effect of alirocumab, a monoclonal proprotein convertase subtilisin/kexin 9 antibody, on lipoprotein(a) concentrations (a pooled analysis of 150 mg every two weeks dosing from phase 2 trials). *Am. J. Cardiol.* 114, 711–715.
- Gavish, D., Azrolan, N., and Breslow, J.L. (1989). Plasma Ip(a) concentration is inversely correlated with the ratio of Kringle IV/Kringle V encoding domains in the apo(a) gene. *J Clin Invest* 84, 2021–2027.
- Gaw, A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (1994). Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups. Evidence for no common “null” allele at the apo(a) locus. *J. Clin. Invest.* 93, 2526–2534.
- Geiss, H.C., Ritter, M.M., Richter, W.O., Schwandt, P., and Zachoval, R. (1996). Low lipoprotein (a) levels during acute viral hepatitis. *Hepatology* 24, 1334–1337.
- Gencer, B., and Mach, F. (2020). Potential of Lipoprotein(a)-Lowering Strategies in Treating Coronary Artery Disease. *Drugs* 80, 229–239.
- Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33–45.
- Gheini, M.R., Jafari, E., Ahmadi, A., Togha, M., Saidinia, S., and Moradi, M. (2014). Comparison of serum lipoprotein (a) level between non-cardioembolic ischemic stroke and traumatic brain injury. *Clin. Lab.* 60, 701–705.
- Gibbons, G.F., Wiggins, D., Brown, A.-M., and Hebbachi, A.-M. (2004). Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 59–64.

- Gordon, S.M., Deng, J., Lu, L.J., and Davidson, W.S. (2010). Proteomic characterization of human plasma high density lipoprotein fractionated by gel filtration chromatography. *J. Proteome Res.* 9, 5239–5249.
- Gotoh, T., Kuroda, T., Yamasawa, M., Nishinaga, M., Mitsunashi, T., Seino, Y., Nagoh, N., Kayaba, K., Yamada, S., and Matsuo, H. (1995). Correlation between lipoprotein(a) and aortic valve sclerosis assessed by echocardiography (the JMS Cardiac Echo and Cohort Study). *Am. J. Cardiol.* 76, 928–932.
- Gotto, A.M., Pownall, H.J., and Havel, R.J. (1986). Introduction to the plasma lipoproteins. *Meth. Enzymol.* 128, 3–41.
- de Graaf, J., Couture, P., and Sniderman, A. (2008). A diagnostic algorithm for the atherogenic apolipoprotein B dyslipoproteinemias. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4, 608–618.
- Gregory, W.L., Game, F.L., Farrer, M., Idle, J.R., Laker, M.F., and James, O.F. (1994). Reduced serum lipoprotein(a) levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Atherosclerosis* 105, 43–50.
- Gudbjartsson, D.F., Thorgeirsson, G., Sulem, P., Helgadottir, A., Gylfason, A., Saemundsdottir, J., Bjornsson, E., Norddahl, G.L., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., et al. (2019). Lipoprotein(a) Concentration and Risks of Cardiovascular Disease and Diabetes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 74, 2982–2994.
- Guevara, J., Jan, A.Y., Knapp, R., Tulinsky, A., and Morrisett, J.D. (1993a). Comparison of ligand-binding sites of modeled apo[a] kringle-like sequences in human lipoprotein[a]. *Arterioscler. Thromb.* 13, 758–770.
- Guevara, J., Spurlino, J., Jan, A.Y., Yang, C.Y., Tulinsky, A., Prasad, B.V., Gaubatz, J.W., and Morrisett, J.D. (1993b). Proposed mechanisms for binding of apo[a] kringle type 9 to apo B-100 in human lipoprotein[a]. *Biophys. J.* 64, 686–700.
- Gurdasani, D., Sjouke, B., Tsimikas, S., Hovingh, G.K., Luben, R.N., Wainwright, N.W.J., Pomilla, C., Wareham, N.J., Khaw, K.-T., Boekholdt, S.M., et al. (2012). Lipoprotein(a) and risk of coronary, cerebrovascular, and peripheral artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 3058–3065.

## H

- Haffner, S.M., Tuttle, K.R., and Rainwater, D.L. (1991). Decrease of lipoprotein(a) with improved glycemic control in IDDM subjects. *Diabetes Care* 14, 302–307.
- Haffner, S.M., Morales, P.A., Stern, M.P., and Gruber, M.K. (1992). Lp(a) concentrations in NIDDM. *Diabetes* 41, 1267–1272.

- Harpel, P.C., Gordon, B.R., and Parker, T.S. (1989). Plasmin catalyzes binding of lipoprotein (a) to immobilized fibrinogen and fibrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 3847–3851.
- Havekes, L., Vermeer, B.J., Brugman, T., and Emeis, J. (1981). Binding of LP(a) to the low density lipoprotein receptor of human fibroblasts. *FEBS Lett.* *132*, 169–173.
- Havel, R.J., Eder, H.A., and Bragdon, J.H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* *34*, 1345–1353.
- Helgadóttir, A., Gretarsdóttir, S., Thorleifsson, G., Holm, H., Patel, R.S., Gudnason, T., Jones, G.T., van Rij, A.M., Eapen, D.J., Baas, A.F., et al. (2012). Apolipoprotein(a) genetic sequence variants associated with systemic atherosclerosis and coronary atherosclerotic burden but not with venous thromboembolism. *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 722–729.
- Helmholt, M., Bigge, J., Muche, R., Mainoo, J., Thiery, J., Seidel, D., and Armstrong, V.W. (1991). Contribution of the apo[a] phenotype to plasma Lp[a] concentrations shows considerable ethnic variation. *J. Lipid Res.* *32*, 1919–1928.
- Heng, C.K., Saha, N., and Tay, J.S. (1995). Lack of association of apolipoprotein E polymorphism with plasma Lp(a) levels in the Chinese. *Clin. Genet.* *48*, 113–119.
- Hervio, L., Durlach, V., Girard-Globa, A., and Anglés-Cano, E. (1995). Multiple binding with identical linkage: a mechanism that explains the effect of lipoprotein(a) on fibrinolysis. *Biochemistry* *34*, 13353–13358.
- Hirowatari, Y., Manita, D., Kamachi, K., and Tanaka, A. (2017). Effect of dietary modification by calorie restriction on cholesterol levels in lipoprotein(a) and other lipoprotein classes. *Ann. Clin. Biochem.* *54*, 567–576.
- Hislop, M.S., St Clair Gibson, A., Lambert, M.I., Noakes, T.D., and Marais, A.D. (2001). Effects of androgen manipulation on postprandial triglyceridaemia, low-density lipoprotein particle size and lipoprotein(a) in men. *Atherosclerosis* *159*, 425–432.
- Hofmann, S.L., Eaton, D.L., Brown, M.S., McConathy, W.J., Goldstein, J.L., and Hammer, R.E. (1990). Overexpression of human low density lipoprotein receptors leads to accelerated catabolism of Lp(a) lipoprotein in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* *85*, 1542–1547.
- Hollstein, T., Vogt, A., Grenkowitz, T., Stojakovic, T., März, W., Laufs, U., Bölükbasi, B., Steinhagen-Thiessen, E., Scharnagl, H., and Kassner, U. (2019). Treatment with PCSK9 inhibitors reduces atherogenic VLDL remnants in a real-world study. *Vascular Pharmacology* *116*, 8–15.
- Hoofnagle, A.N., and Wener, M.H. (2009). The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J. Immunol. Methods* *347*, 3–11.

- Hopewell, J.C., Clarke, R., Parish, S., Armitage, J., Lathrop, M., Hager, J., Collins, R., and Heart Protection Study Collaborative Group (2011). Lipoprotein(a) genetic variants associated with coronary and peripheral vascular disease but not with stroke risk in the Heart Protection Study. *Circ Cardiovasc Genet* 4, 68–73.
- Hopewell, J.C., Haynes, R., and Baigent, C. (2018). The role of lipoprotein (a) in chronic kidney disease. *J. Lipid Res.* 59, 577–585.
- Hovingh, G.K., Kastelein, J.J.P., van Deventer, S.J.H., Round, P., Ford, J., Saleheen, D., Rader, D.J., Brewer, H.B., and Barter, P.J. (2015). Cholesterol ester transfer protein inhibition by TA-8995 in patients with mild dyslipidaemia (TULIP): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet* 386, 452–460.
- HPS2-THRIVE Collaborative Group, Landray, M.J., Haynes, R., Hopewell, J.C., Parish, S., Aung, T., Tomson, J., Wallendszus, K., Craig, M., Jiang, L., et al. (2014). Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* 371, 203–212.
- HPS3/TIMI55–REVEAL Collaborative Group, Bowman, L., Hopewell, J.C., Chen, F., Wallendszus, K., Stevens, W., Collins, R., Wiviott, S.D., Cannon, C.P., Braunwald, E., et al. (2017). Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 377, 1217–1227.
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., and Graham Cooks, R. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 40, 430–443.
- Huang, Y., Liu, X.Q., Rall, S.C., Taylor, J.M., von Eckardstein, A., Assmann, G., and Mahley, R.W. (1998). Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. *J. Biol. Chem.* 273, 26388–26393.

## I

- Ichikawa, T., Unoki, H., Sun, H., Shimoyamada, H., Marcovina, S., Shikama, H., Watanabe, T., and Fan, J. (2002). Lipoprotein(a) promotes smooth muscle cell proliferation and dedifferentiation in atherosclerotic lesions of human apo(a) transgenic rabbits. *Am. J. Pathol.* 160, 227–236.
- Ichinose, A., and Kuriyama, M. (1995). Detection of polymorphisms in the 5'-flanking region of the gene for apolipoprotein(a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 372–378.
- Ikewaki, K., Cain, W., Thomas, F., Shamburek, R., Zech, L.A., Usher, D., Brewer, H.B., and Rader, D.J. (2004). Abnormal in vivo metabolism of apoB-containing lipoproteins in human apoE deficiency. *J. Lipid Res.* 45, 1302–1311.
- Innerarity, T.L., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Bersot, T.P. (1978). Apoprotein (E--A-II) complex of human plasma lipoproteins. II. Receptor binding activity of a high

- density lipoprotein subfraction modulated by the apo(E--A-II) complex. *J. Biol. Chem.* 253, 6289–6295.
- Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Arnold, K.S., Mahley, R.W., Krauss, R.M., Vega, G.L., and Grundy, S.M. (1987). Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6919–6923.
  - Irshad, M. (2004). Serum lipoprotein (a) levels in liver diseases caused by hepatitis. *Indian J. Med. Res.* 120, 542–545.

## J

- Jaeger, B.R., Richter, Y., Nagel, D., Heigl, F., Vogt, A., Roeseler, E., Parhofer, K., Ramlow, W., Koch, M., Utermann, G., et al. (2009). Longitudinal cohort study on the effectiveness of lipid apheresis treatment to reduce high lipoprotein(a) levels and prevent major adverse coronary events. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 6, 229–239.
- Jawi, M.M., Frohlich, J., and Chan, S.Y. (2020). Lipoprotein(a) the Insurgent: A New Insight into the Structure, Function, Metabolism, Pathogenicity, and Medications Affecting Lipoprotein(a) Molecule. *J Lipids* 2020, 3491764.
- Jenkins, A.J., Steele, J.S., Janus, E.D., Santamaria, J.D., and Best, J.D. (1992). Plasma apolipoprotein (a) is increased in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetologia* 35, 1055–1059.
- Jenner, J.L., Ordovas, J.M., Lamon-Fava, S., Schaefer, M.M., Wilson, P.W., Castelli, W.P., and Schaefer, E.J. (1993). Effects of age, sex, and menopausal status on plasma lipoprotein(a) levels. The Framingham Offspring Study. *Circulation* 87, 1135–1141.
- Jenner, J.L., Seman, L.J., Millar, J.S., Lamon-Fava, S., Welty, F.K., Dolnikowski, G.G., Marcovina, S.M., Lichtenstein, A.H., Barrett, P.H.R., deLuca, C., et al. (2005). The metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein (a) in human beings. *Metab. Clin. Exp.* 54, 361–369.
- Ji, Z.S., Fazio, S., and Mahley, R.W. (1994). Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia. *J. Biol. Chem.* 269, 13421–13428.

## K

- Kamstrup, P.R., Tybjaerg-Hansen, A., Steffensen, R., and Nordestgaard, B.G. (2009). Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA* 301, 2331–2339.
- Kamstrup, P.R., Tybjaerg-Hansen, A., and Nordestgaard, B.G. (2012). Genetic evidence that lipoprotein(a) associates with atherosclerotic stenosis rather than venous thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1732–1741.

- Kamstrup, P.R., Tybjaerg-Hansen, A., and Nordestgaard, B.G. (2014). Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J. Am. Coll. Cardiol.* *63*, 470–477.
- Kelly, E., and Hemphill, L. (2017). Lipoprotein(a): A Lipoprotein Whose Time Has Come. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* *19*, 48.
- Kervinen, K., Savolainen, M.J., and Kesäniemi, Y.A. (1991). A rapid increase in lipoprotein (a) levels after ethanol withdrawal in alcoholic men. *Life Sci.* *48*, 2183–2188.
- Khan, T.A., Shah, T., Prieto, D., Zhang, W., Price, J., Fowkes, G.R., Cooper, J., Talmud, P.J., Humphries, S.E., Sundstrom, J., et al. (2013). Apolipoprotein E genotype, cardiovascular biomarkers and risk of stroke: systematic review and meta-analysis of 14,015 stroke cases and pooled analysis of primary biomarker data from up to 60,883 individuals. *Int J Epidemiol* *42*, 475–492.
- Khantalın, I., Blanchard, V., Viallet, N., and Lambert, G. (2019). Recurrent coronary syndromes in a patient with isolated very-high lipoprotein (a) and the prothrombin genetic variant rs1799963 (G20210A): a case report. *Eur Heart J Case Rep* *3*, ytz019.
- Khera, A.V., Everett, B.M., Caulfield, M.P., Hantash, F.M., Wohlgemuth, J., Ridker, P.M., and Mora, S. (2014). Lipoprotein(a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *Circulation* *129*, 635–642.
- Khvorova, A. (2017). Oligonucleotide Therapeutics - A New Class of Cholesterol-Lowering Drugs. *N. Engl. J. Med.* *376*, 4–7.
- Kiechl, S., Willeit, J., Mayr, M., Viehweider, B., Oberhollenzer, M., Kronenberg, F., Wiedermann, C.J., Oberthaler, S., Xu, Q., Witztum, J.L., et al. (2007). Oxidized phospholipids, lipoprotein(a), lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and 10-year cardiovascular outcomes: prospective results from the Bruneck study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 1788–1795.
- Kinpara, K., Okada, H., Yoneyama, A., Okubo, M., and Murase, T. (2011). Lipoprotein(a)-cholesterol: a significant component of serum cholesterol. *Clin. Chim. Acta* *412*, 1783–1787.
- Klausen, I.C., Schmidt, E.B., Lervang, H.H., Gerdes, L.U., Ditzel, J., and Faergeman, O. (1992). Normal lipoprotein(a) concentrations and apolipoprotein(a) isoforms in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* *22*, 538–541.
- Klausen, I.C., Gerdes, L.U., Hansen, P.S., Lemming, L., Gerdes, C., and Faergeman, O. (1996). Effects of apoE gene polymorphism on Lp(a) concentrations depend on the size of apo(a): a study of 466 white men. *J. Mol. Med.* *74*, 685–690.

- Klezovitch, O., Edelstein, C., and Scanu, A.M. (2001). Stimulation of interleukin-8 production in human THP-1 macrophages by apolipoprotein(a). Evidence for a critical involvement of elements in its C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276, 46864–46869.
- Knight, B.L. (1994). Lp(a) catabolism in hypercholesterolaemic individuals. *Chem. Phys. Lipids* 67–68, 233–239.
- de Knijff, P., Kaptein, A., Boomsma, D., Princen, H.M., Frants, R.R., and Havekes, L.M. (1991). Apolipoprotein E polymorphism affects plasma levels of lipoprotein(a). *Atherosclerosis* 90, 169–174.
- Ko, C.-W., Qu, J., Black, D.D., and Tso, P. (2020). Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*
- Komai, N., Morishita, R., Yamada, S., Oishi, M., Iguchi, S., Aoki, M., Sasaki, M., Sakurabayashi, I., Higaki, J., and Ogihara, T. (2002). Mitogenic activity of oxidized lipoprotein (a) on human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 40, 310–314.
- Koopal, C., van der Graaf, Y., Asselbergs, F.W., Westerink, J., Visseren, F.L.J., and SMART study group (2015). Influence of APOE-2 genotype on the relation between adiposity and plasma lipid levels in patients with vascular disease. *Int J Obes (Lond)* 39, 265–269.
- Koopal, C., Marais, A.D., and Visseren, F.L.J. (2017). Familial dysbetalipoproteinemia: an underdiagnosed lipid disorder. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 24, 133–139.
- Koschinsky, M.L., Côté, G.P., Gabel, B., and van der Hoek, Y.Y. (1993). Identification of the cysteine residue in apolipoprotein(a) that mediates extracellular coupling with apolipoprotein B-100. *J. Biol. Chem.* 268, 19819–19825.
- Kostner, G.M., Avogaro, P., Cazzolato, G., Marth, E., Bittolo-Bon, G., and Qunici, G.B. (1981). Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 38, 51–61.
- Kostner, G.M., Gavish, D., Leopold, B., Bolzano, K., Weintraub, M.S., and Breslow, J.L. (1989). HMG CoA reductase inhibitors lower LDL cholesterol without reducing Lp(a) levels. *Circulation* 80, 1313–1319.
- Kostner, K.M., Maurer, G., Huber, K., Stefenelli, T., Dieplinger, H., Steyrer, E., and Kostner, G.M. (1996). Urinary excretion of apo(a) fragments. Role in apo(a) catabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 905–911.
- Kostner, K.M., März, W., and Kostner, G.M. (2013). When should we measure lipoprotein (a)? *Eur. Heart J.* 34, 3268–3276.
- Kraft, H.G., Menzel, H.J., Hoppichler, F., Vogel, W., and Utermann, G. (1989). Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. *J. Clin. Invest.* 83, 137–142.

- Kraft, H.G., Köchl, S., Menzel, H.J., Sandholzer, C., and Utermann, G. (1992a). The apolipoprotein (a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein (a) concentration. *Hum. Genet.* *90*, 220–230.
- Kraft, H.G., Sandholzer, C., Menzel, H.J., and Utermann, G. (1992b). Apolipoprotein (a) alleles determine lipoprotein (a) particle density and concentration in plasma. *Arterioscler. Thromb.* *12*, 302–306.
- Kraft, H.G., Lingenhel, A., Pang, R.W., Delport, R., Trommsdorff, M., Vermaak, H., Janus, E.D., and Utermann, G. (1996). Frequency distributions of apolipoprotein(a) kringle IV repeat alleles and their effects on lipoprotein(a) levels in Caucasian, Asian, and African populations: the distribution of null alleles is non-random. *Eur. J. Hum. Genet.* *4*, 74–87.
- Kraft, H.G., Lingenhel, A., Raal, F.J., Hohenegger, M., and Utermann, G. (2000). Lipoprotein(a) in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 522–528.
- Kratzin, H., Armstrong, V.W., Niehaus, M., Hilschmann, N., and Seidel, D. (1987). Structural relationship of an apolipoprotein (a) phenotype (570 kDa) to plasminogen: homologous kringle domains are linked by carbohydrate-rich regions. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* *368*, 1533–1544.
- Krempler, F., Kostner, G., Bolzano, K., and Sandhofer, F. (1979). Lipoprotein (a) is not a metabolic product of other lipoproteins containing apolipoprotein B. *Biochim. Biophys. Acta* *575*, 63–70.
- Kritharides, L., Nordestgaard, B.G., Tybjærg-Hansen, A., Kamstrup, P.R., and Afzal, S. (2017). Effect of APOE ε Genotype on Lipoprotein(a) and the Associated Risk of Myocardial Infarction and Aortic Valve Stenosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *102*, 3390–3399.
- Kronenberg, F. (2016). Human Genetics and the Causal Role of Lipoprotein(a) for Various Diseases. *Cardiovasc Drugs Ther* *30*, 87–100.
- Kronenberg, F. (2019). Prediction of cardiovascular risk by Lp(a) concentrations or genetic variants within the LPA gene region. *Clin Res Cardiol Suppl* *14*, 5–12.
- Kronenberg, F., and Utermann, G. (2013). Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J. Intern. Med.* *273*, 6–30.
- Kronenberg, F., Trenkwalder, E., Dieplinger, H., and Utermann, G. (1996). Lipoprotein(a) in stored plasma samples and the ravages of time. Why epidemiological studies might fail. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *16*, 1568–1572.
- Kronenberg, F., Trenkwalder, E., Lingenhel, A., Friedrich, G., Lhotta, K., Schober, M., Moes, N., König, P., Utermann, G., and Dieplinger, H. (1997). Renovascular arteriovenous differences in Lp[a] plasma concentrations suggest removal of Lp[a] from the renal circulation. *J. Lipid Res.* *38*, 1755–1763.

- Kronenberg, F., Kuen, E., Ritz, E., Junker, R., König, P., Kraatz, G., Lhotta, K., Mann, J.F., Müller, G.A., Neyer, U., et al. (2000). Lipoprotein(a) serum concentrations and apolipoprotein(a) phenotypes in mild and moderate renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* *11*, 105–115.
- Ky, B., Burke, A., Tsimikas, S., Wolfe, M.L., Tadesse, M.G., Szapary, P.O., Witztum, J.L., FitzGerald, G.A., and Rader, D.J. (2008). The influence of pravastatin and atorvastatin on markers of oxidative stress in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* *51*, 1653–1662.
- Kyriakou, T., Seedorf, U., Goel, A., Hopewell, J.C., Clarke, R., Watkins, H., Farrall, M., and PROCARDIS Consortium (2014). A common LPA null allele associates with lower lipoprotein(a) levels and coronary artery disease risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 2095–2099.

## L

- Lackner, C., Boerwinkle, E., Leffert, C.C., Rahmig, T., and Hobbs, H.H. (1991). Molecular basis of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Invest.* *87*, 2153–2161.
- Lackner, C., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (1993). Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Hum. Mol. Genet.* *2*, 933–940.
- Lam, S.M., and Shui, G. (2013). Lipidomics as a principal tool for advancing biomedical research. *J Genet Genomics* *40*, 375–390.
- Lambert, G., Sjouke, B., Choque, B., Kastelein, J.J.P., and Hovingh, G.K. (2012). The PCSK9 decade. *J. Lipid Res.* *53*, 2515–2524.
- Lambert, G., Thedrez, A., Croyal, M., Ramin-Mangata, S., Couret, D., Diotel, N., Nobécourt-Dupuy, E., Krempf, M., LeBail, J.C., Poirier, B., et al. (2017). The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies. *Clin Sci (Lond)* *131*, 261–268.
- Lamina, C., and Kronenberg, F. (2019). Estimation of the Required Lipoprotein(a)-Lowering Therapeutic Effect Size for Reduction in Coronary Heart Disease Outcomes: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Cardiol* *4*, 575–579.
- Lamina, C., Kronenberg, F., and Lp(a)-GWAS-Consortium (2019). Estimation of the Required Lipoprotein(a)-Lowering Therapeutic Effect Size for Reduction in Coronary Heart Disease Outcomes: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Cardiol* *4*, 575–579.
- Lamon-Fava, S., Jimenez, D., Christian, J.C., Fabsitz, R.R., Reed, T., Carmelli, D., Castelli, W.P., Ordovas, J.M., Wilson, P.W., and Schaefer, E.J. (1991). The NHLBI Twin Study: heritability of apolipoprotein A-I, B, and low density lipoprotein subclasses and concordance for lipoprotein(a). *Atherosclerosis* *91*, 97–106.

- Langer, K.H., Utermann, G., and Menzel, H.J. (1974). On the polypeptide composition of an abnormal high density lipoprotein (LP-E) occurring in LCAT-deficient plasma. *FEBS Lett.* *45*, 29–32.
- Langsted, A., and Nordestgaard, B.G. (2019). Antisense Oligonucleotides Targeting Lipoprotein(a). *Curr Atheroscler Rep* *21*, 30.
- Langsted, A., Kamstrup, P.R., and Nordestgaard, B.G. (2014). Lipoprotein(a): fasting and nonfasting levels, inflammation, and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* *234*, 95–101.
- Langsted, A., Nordestgaard, B.G., Benn, M., Tybjaerg-Hansen, A., and Kamstrup, P.R. (2016). PCSK9 R46L Loss-of-Function Mutation Reduces Lipoprotein(a), LDL Cholesterol, and Risk of Aortic Valve Stenosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 3281–3287.
- Langsted, A., Kamstrup, P.R., and Nordestgaard, B.G. (2017). High Lipoprotein(a) and Low Risk of Major Bleeding in Brain and Airways in the General Population: a Mendelian Randomization Study. *Clin. Chem.* *63*, 1714–1723.
- Langsted, A., Nordestgaard, B.G., and Kamstrup, P.R. (2019a). Elevated Lipoprotein(a) and Risk of Ischemic Stroke. *J. Am. Coll. Cardiol.* *74*, 54–66.
- Langsted, A., Kamstrup, P.R., and Nordestgaard, B.G. (2019b). High lipoprotein(a) and high risk of mortality. *Eur. Heart J.* *40*, 2760–2770.
- Langsted, A., Kamstrup, P.R., and Nordestgaard, B.G. (2019c). Response to “Lipoprotein(a): it is not the cholesterol content: it is the apolipoprotein(a)!” *Eur. Heart J.* *40*, 3577.
- Laschkolnig, A., Kollerits, B., Lamina, C., Meisinger, C., Rantner, B., Stadler, M., Peters, A., Koenig, W., Stöckl, A., Dähnhardt, D., et al. (2014). Lipoprotein (a) concentrations, apolipoprotein (a) phenotypes, and peripheral arterial disease in three independent cohorts. *Cardiovasc. Res.* *103*, 28–36.
- Lee, J., and Hegele, R.A. (2014). Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *J. Inherit. Metab. Dis.* *37*, 333–339.
- Leebmann, J., Roeseler, E., Julius, U., Heigl, F., Spitthoever, R., Heutling, D., Breitenberger, P., Maerz, W., Lehmacher, W., Heibges, A., et al. (2013). Lipoprotein apheresis in patients with maximally tolerated lipid-lowering therapy, lipoprotein(a)-hyperlipoproteinemia, and progressive cardiovascular disease: prospective observational multicenter study. *Circulation* *128*, 2567–2576.
- Leibundgut, G., Scipione, C., Yin, H., Schneider, M., Boffa, M.B., Green, S., Yang, X., Dennis, E., Witztum, J.L., Koschinsky, M.L., et al. (2013). Determinants of binding of oxidized phospholipids on apolipoprotein (a) and lipoprotein (a). *J. Lipid Res.* *54*, 2815–2830.

- Levitsky, L.L., Scanu, A.M., and Gould, S.H. (1991). Lipoprotein(a) levels in black and white children and adolescents with IDDM. *Diabetes Care* 14, 283–287.
- Li, H., Dhanasekaran, P., Alexander, E.T., Rader, D.J., Phillips, M.C., and Lund-Katz, S. (2013). Molecular mechanisms responsible for the differential effects of apoE3 and apoE4 on plasma lipoprotein-cholesterol levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 687–693.
- Li, J., Lange, L.A., Sabourin, J., Duan, Q., Valdar, W., Willis, M.S., Li, Y., Wilson, J.G., and Lange, E.M. (2015). Genome- and exome-wide association study of serum lipoprotein (a) in the Jackson Heart Study. *J. Hum. Genet.* 60, 755–761.
- Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Carrasco, W., Jenner, J.L., Gualtieri, L.J., Goldin, B.R., Ordovas, J.M., and Schaefer, E.J. (1993). Effects of canola, corn, and olive oils on fasting and postprandial plasma lipoproteins in humans as part of a National Cholesterol Education Program Step 2 diet. *Arterioscler. Thromb.* 13, 1533–1542.
- Lindahl, G., Maily, F., Humphries, S., and Seed, M. (1994). Apolipoprotein E phenotype and lipoprotein(a) in familial hypercholesterolaemia: implication for lipoprotein(a) metabolism. *Clin Investig* 72, 631–638.
- Linton, M.F., Gish, R., Hubl, S.T., Bütler, E., Esquivel, C., Bry, W.I., Boyles, J.K., Wardell, M.R., and Young, S.G. (1991). Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J. Clin. Invest.* 88, 270–281.
- Liu, L., Craig, A.W., Meldrum, H.D., Marcovina, S.M., Elliott, B.E., and Koschinsky, M.L. (2009). Apolipoprotein(a) stimulates vascular endothelial cell growth and migration and signals through integrin alphaVbeta3. *Biochem. J.* 418, 325–336.
- Lobentanz, E.M., Krasznai, K., Gruber, A., Brunner, C., Müller, H.J., Sattler, J., Kraft, H.G., Utermann, G., and Dieplinger, H. (1998). Intracellular metabolism of human apolipoprotein(a) in stably transfected Hep G2 cells. *Biochemistry* 37, 5417–5425.

## M

- Ma, L., Chan, D.C., Ooi, E.M.M., Marcovina, S.M., Barrett, P.H.R., and Watts, G.F. (2019a). Apolipoprotein(a) Kinetics in Statin-Treated Patients With Elevated Plasma Lipoprotein(a) Concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 6247–6255.
- Ma, L., Waldmann, E., Ooi, E.M.M., Chan, D.C., Barrett, H.P.R., Watts, G.F., and Parhofer, K.G. (2019b). Lipoprotein (a) and Low-density lipoprotein apolipoprotein B metabolism following apheresis in patients with elevated lipoprotein(a) and coronary artery disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 49, e13053.
- Mach, F., Baigent, C., Catapano, A.L., Koskinas, K.C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M.J., De Backer, G.G., Delgado, V., Ference, B.A., et al. (2020). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* 41, 111–188.

- Mack, S., Coassin, S., Rueedi, R., Yousri, N.A., Seppälä, I., Gieger, C., Schönherr, S., Forer, L., Erhart, G., Marques-Vidal, P., et al. (2017). A genome-wide association meta-analysis on lipoprotein (a) concentrations adjusted for apolipoprotein (a) isoforms. *J. Lipid Res.* 58, 1834–1844.
- Mackinnon, L.T., Hubinger, L., and Lepre, F. (1997). Effects of physical activity and diet on lipoprotein(a). *Med Sci Sports Exerc* 29, 1429–1436.
- Madsen, C.M., Kamstrup, P.R., Langsted, A., Varbo, A., and Nordestgaard, B.G. (2020). Lipoprotein(a)-Lowering by 50 mg/dL (105 nmol/L) May Be Needed to Reduce Cardiovascular Disease 20% in Secondary Prevention: A Population-Based Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40, 255–266.
- Mahley, R.W. (1996). Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. *Isr. J. Med. Sci.* 32, 414–429.
- Mahley, R.W. (2016). Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J. Mol. Med.* 94, 739–746.
- Mahley, R.W., and Ji, Z.S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 40, 1–16.
- Mahley, R.W., Huang, Y., and Rall, S.C. (1999). Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J. Lipid Res.* 40, 1933–1949.
- Mahmood, T., Minnier, J., Ito, M.K., Li, Q.H., Koren, A., Kam, I.W., Fazio, S., and Shapiro, M.D. (2020). Discordant responses of plasma low-density lipoprotein cholesterol and lipoprotein(a) to alirocumab: A pooled analysis from 10 ODYSSEY Phase 3 studies. *Eur J Prev Cardiol* 2047487320915803.
- Maio, S.D., Streiter, G., Grüneis, R., Lamina, C., Maglione, M., Öfner, D., Thorand, B., Peters, A., Eckardt, K.-U., Köttgen, A., et al. (2019). Investigation of an LPA KIV-2 nonsense mutation in 11,000 individuals: the importance of linkage disequilibrium structure in LPA genetics. *BioRxiv* 848945.
- Malaguarnera, M., Giugno, I., Trovato, B.A., Panebianco, M.P., Siciliano, R., and Ruello, P. (1995). Lipoprotein(a) concentration in patients with chronic active hepatitis C before and after interferon treatment. *Clin Ther* 17, 721–728.
- Mancini, F.P., Mooser, V., Guerra, R., and Hobbs, H.H. (1995). Sequence microheterogeneity in apolipoprotein(a) gene repeats and the relationship to plasma Lp(a) levels. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1535–1542.
- Marais, A.D. (2019). Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* 51, 165–176.

- Marais, D. (2015). Dysbetalipoproteinemia: an extreme disorder of remnant metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* *26*, 292–297.
- Maranhão, R.C., Carvalho, P.O., Strunz, C.C., and Pileggi, F. (2014). Lipoprotein (a): structure, pathophysiology and clinical implications. *Arq. Bras. Cardiol.* *103*, 76–84.
- Marcovina, S.M., and Albers, J.J. (2016). Lipoprotein (a) measurements for clinical application. *J Lipid Res* *57*, 526–537.
- Marcovina, S.M., Albers, J.J., Jacobs, D.R., Perkins, L.L., Lewis, C.E., Howard, B.V., and Savage, P. (1993). Lipoprotein[a] concentrations and apolipoprotein[a] phenotypes in Caucasians and African Americans. The CARDIA study. *Arterioscler. Thromb.* *13*, 1037–1045.
- Marcovina, S.M., Albers, J.J., Gabel, B., Koschinsky, M.L., and Gaur, V.P. (1995). Effect of the number of apolipoprotein(a) kringle 4 domains on immunochemical measurements of lipoprotein(a). *Clin. Chem.* *41*, 246–255.
- Marcovina, S.M., Albers, J.J., Wijsman, E., Zhang, Z., Chapman, N.H., and Kennedy, H. (1996). Differences in Lp[a] concentrations and apo[a] polymorphs between black and white Americans. *J. Lipid Res.* *37*, 2569–2585.
- Marduel, M., Ouguerram, K., Serre, V., Bonnefont-Rousselot, D., Marques-Pinheiro, A., Erik Berge, K., Devillers, M., Luc, G., Lecerf, J.-M., Tosolini, L., et al. (2013). Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation. *Hum. Mutat.* *34*, 83–87.
- Marth, E., Cazzolato, G., Bittolo Bon, G., Avogaro, P., and Kostner, G.M. (1982). Serum concentrations of Lp(a) and other lipoprotein parameters in heavy alcohol consumers. *Ann. Nutr. Metab.* *26*, 56–62.
- Martinez, L.O., Jacquet, S., Esteve, J.-P., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J.E., Tercé, F., et al. (2003). Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* *421*, 75–79.
- Martinez, L.O., Genoux, A., Ferrières, J., Duparc, T., and Perret, B. (2017). Serum inhibitory factor 1, high-density lipoprotein and cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* *28*, 337–346.
- Martínez-Morillo, E., Nielsen, H.M., Batruch, I., Drabovich, A.P., Begcevic, I., Lopez, M.F., Minthon, L., Bu, G., Mattsson, N., Portelius, E., et al. (2014). Assessment of peptide chemical modifications on the development of an accurate and precise multiplex selected reaction monitoring assay for apolipoprotein e isoforms. *J. Proteome Res.* *13*, 1077–1087.
- Mawer, J.S.P., and Leach, D.R.F. (2013). Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial chromosomes. *Methods Mol. Biol.* *1054*, 187–194.

- McCormick, S.P.A., and Schneider, W.J. (2019). Lipoprotein(a) catabolism: a case of multiple receptors. *Pathology* 51, 155–164.
- McCormick, S.P., Ng, J.K., Taylor, S., Flynn, L.M., Hammer, R.E., and Young, S.G. (1995). Mutagenesis of the human apolipoprotein B gene in a yeast artificial chromosome reveals the site of attachment for apolipoprotein(a). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10147–10151.
- McKenney, J.M., Koren, M.J., Kereiakes, D.J., Hanotin, C., Ferrand, A.-C., and Stein, E.A. (2012). Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59, 2344–2353.
- McLean, J.W., Tomlinson, J.E., Kuang, W.J., Eaton, D.L., Chen, E.Y., Fless, G.M., Scanu, A.M., and Lawn, R.M. (1987). cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330, 132–137.
- Mefford, M.T., Marcovina, S.M., Bittner, V., Cushman, M., Brown, T.M., Farkouh, M.E., Tsimikas, S., Monda, K.L., López, J.A.G., Muntner, P., et al. (2019). PCSK9 loss-of-function variants and Lp(a) phenotypes among black US adults. *J. Lipid Res.* 60, 1946–1952.
- Mendel, D.B., and Crabtree, G.R. (1991). HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 677–680.
- Mooser, V., Mancini, F.P., Bopp, S., Pethö-Schramm, A., Guerra, R., Boerwinkle, E., Müller, H.J., and Hobbs, H.H. (1995). Sequence polymorphisms in the apo(a) gene associated with specific levels of Lp(a) in plasma. *Hum. Mol. Genet.* 4, 173–181.
- Mooser, V., Marcovina, S.M., White, A.L., and Hobbs, H.H. (1996). Kringle-containing fragments of apolipoprotein(a) circulate in human plasma and are excreted into the urine. *J. Clin. Invest.* 98, 2414–2424.
- Mora, S., Kamstrup, P.R., Rifai, N., Nordestgaard, B.G., Buring, J.E., and Ridker, P.M. (2010). Lipoprotein(a) and risk of type 2 diabetes. *Clin. Chem.* 56, 1252–1260.
- Moriarty, P.M. (2015). Lipoprotein apheresis: present and future uses. *Curr. Opin. Lipidol.* 26, 544–552.
- Moriarty, P.M., and Gibson, C.A. (2005). Effect of low-density lipoprotein apheresis on lipoprotein-associated phospholipase A2. *Am. J. Cardiol.* 95, 1246–1247.
- Moriarty, P.M., Varvel, S.A., Gordts, P.L.S.M., McConnell, J.P., and Tsimikas, S. (2017). Lipoprotein(a) Mass Levels Increase Significantly According to APOE Genotype: An Analysis of 431 239 Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 580–588.
- Moriarty, P.M., Gray, J.V., and Gorby, L.K. (2019). Lipoprotein apheresis for lipoprotein(a) and cardiovascular disease. *J Clin Lipidol* 13, 894–900.

- Moriarty Patrick M., Varvel Stephen A., Gordts Philip L.S.M., McConnell Joseph P., and Tsimikas Sotirios (2017). Lipoprotein(a) Mass Levels Increase Significantly According to APOE Genotype. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37, 580–588.
- Muros, M., and Rodríguez-Ferrer, C. (1996). Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4. *Atherosclerosis* 121, 13–21.

## N

- Najjar, R.S., Moore, C.E., and Montgomery, B.D. (2018). Consumption of a defined, plant-based diet reduces lipoprotein(a), inflammation, and other atherogenic lipoproteins and particles within 4 weeks. *Clin Cardiol* 41, 1062–1068.
- Nandakumar, R., Matveyenko, A., Thomas, T., Pavlyha, M., Ngai, C., Holleran, S., Ramakrishnan, R., Ginsberg, H.N., Karmally, W., Marcovina, S.M., et al. (2018). Effects of mipomersen, an apolipoprotein B100 antisense, on lipoprotein (a) metabolism in healthy subjects. *J. Lipid Res.* 59, 2397–2402.
- Nedelkov, D. (2017). Mass Spectrometric Studies of Apolipoprotein Proteoforms and Their Role in Lipid Metabolism and Type 2 Diabetes. *Proteomes* 5.
- Neele, D.M., de Wit, E.C., and Princen, H.M. (1999). Insulin suppresses apolipoprotein(a) synthesis by primary cultures of cynomolgus monkey hepatocytes. *Diabetologia* 42, 41–44.
- Nicholls, S.J., Ruotolo, G., Brewer, H.B., Wang, M.-D., Liu, L., Willey, M.B., Deeg, M.A., Krueger, K.A., and Nissen, S.E. (2016). Evacetrapib alone or in combination with statins lowers lipoprotein(a) and total and small LDL particle concentrations in mildly hypercholesterolemic patients. *J Clin Lipidol* 10, 519-527.e4.
- Nielsen, L.B., Nordestgaard, B.G., Stender, S., Niendorf, A., and Kjeldsen, K. (1995). Transfer of lipoprotein(a) and LDL into aortic intima in normal and in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 1492–1502.
- Nielsen, L.B., Stender, S., Kjeldsen, K., and Nordestgaard, B.G. (1996). Specific accumulation of lipoprotein(a) in balloon-injured rabbit aorta in vivo. *Circ. Res.* 78, 615–626.
- Niemeier, A., Willnow, T., Dieplinger, H., Jacobsen, C., Meyer, N., Hilpert, J., and Beisiegel, U. (1999). Identification of megalin/gp330 as a receptor for lipoprotein(a) in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 552–561.
- Nishikido, T., and Ray, K.K. (2018). Inclisiran for the treatment of dyslipidemia. *Expert Opin Investig Drugs* 27, 287–294.

- Nordestgaard, B.G., Chapman, M.J., Ray, K., Borén, J., Andreotti, F., Watts, G.F., Ginsberg, H., Amarenco, P., Catapano, A., Descamps, O.S., et al. (2010). Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur. Heart J.* *31*, 2844–2853.
- Noureen, A., Fresser, F., Utermann, G., and Schmidt, K. (2015). Sequence variation within the KIV-2 copy number polymorphism of the human LPA gene in African, Asian, and European populations. *PLoS ONE* *10*, e0121582.
- Nsaibia, M.J., Mahmut, A., Boulanger, M.-C., Arsenault, B.J., Bouchareb, R., Simard, S., Witztum, J.L., Clavel, M.-A., Pibarot, P., Bossé, Y., et al. (2016). Autotaxin interacts with lipoprotein(a) and oxidized phospholipids in predicting the risk of calcific aortic valve stenosis in patients with coronary artery disease. *J. Intern. Med.* *280*, 509–517.

## O

- O’Brien, K.D., Reichenbach, D.D., Marcovina, S.M., Kuusisto, J., Alpers, C.E., and Otto, C.M. (1996). Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of “degenerative” valvular aortic stenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *16*, 523–532.
- O’Donoghue, M.L., Fazio, S., Giugliano, R.P., Stroes, E.S.G., Kanevsky, E., Gouni-Berthold, I., Im, K., Lira Pineda, A., Wasserman, S.M., Češka, R., et al. (2019). Lipoprotein(a), PCSK9 Inhibition, and Cardiovascular Risk. *Circulation* *139*, 1483–1492.
- Ooi, E.M., Watts, G.F., Chan, D.C., Pang, J., Tenneti, V.S., Hamilton, S.J., McCormick, S.P., Marcovina, S.M., and Barrett, P.H.R. (2015). Effects of extended-release niacin on the postprandial metabolism of Lp(a) and ApoB-100-containing lipoproteins in statin-treated men with type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *35*, 2686–2693.
- Otto, C.M. (2008). Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1395–1398.
- Ouchterlony, O. (1948). In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand* *25*, 186–191.

## P

- Pamir, N., Hutchins, P.M., Ronsein, G.E., Wei, H., Tang, C., Das, R., Vaisar, T., Plow, E., Schuster, V., Koschinsky, M.L., et al. (2017). Plasminogen promotes cholesterol efflux by the ABCA1 pathway. *JCI Insight* *2*.
- Parish, S., Hopewell, J.C., Hill, M.R., Marcovina, S., Valdes-Marquez, E., Haynes, R., Offer, A., Pedersen, T.R., Baigent, C., Collins, R., et al. (2018). Impact of Apolipoprotein(a) Isoform Size on Lipoprotein(a) Lowering in the HPS2-THRIVE Study. *Circ Genom Precis Med* *11*, e001696.

- Parson, W., Kraft, H.G., Niederstätter, H., Lingenhel, A.W., Köchl, S., Fresser, F., and Utermann, G. (2004). A common nonsense mutation in the repetitive Kringle IV-2 domain of human apolipoprotein(a) results in a truncated protein and low plasma Lp(a). *Hum. Mutat.* *24*, 474–480.
- Percy, A.J., Chambers, A.G., Yang, J., Hardie, D.B., and Borchers, C.H. (2014). Advances in multiplexed MRM-based protein biomarker quantitation toward clinical utility. *Biochim. Biophys. Acta* *1844*, 917–926.
- Perombelon, Y.F., Soutar, A.K., and Knight, B.L. (1994). Variation in lipoprotein(a) concentration associated with different apolipoprotein(a) alleles. *J Clin Invest* *93*, 1481–1492.
- Phillips, M.C. (2014). Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life* *66*, 616–623.
- Piepoli, M.F., Hoes, A.W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A.L., Cooney, M.-T., Corrà, U., Cosyns, B., Deaton, C., et al. (2016). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* *37*, 2315–2381.
- Pirillo, A., and Catapano, A.L. (2018). PCSK9 inhibition and Lp(a) reduction: another piece of the puzzle? *Eur. Heart J.* *39*, 2586–2588.
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* *71*, 343–353.
- Pokrovsky, S.N., Afanasieva, O.I., and Ezhov, M.V. (2016). Lipoprotein(a) apheresis. *Curr. Opin. Lipidol.* *27*, 351–358.
- Prins, J., Leus, F.R., Bouma, B.N., and van Rijn, H.J. (1999). The identification of polymorphisms in the coding region of the apolipoprotein (a) gene--association with earlier identified polymorphic sites and influence on the lipoprotein (a) concentration. *Thromb. Haemost.* *82*, 1709–1717.
- Proc, J.L., Kuzyk, M.A., Hardie, D.B., Yang, J., Smith, D.S., Jackson, A.M., Parker, C.E., and Borchers, C.H. (2010). A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. *J. Proteome Res.* *9*, 5422–5437.
- Pryma, C.S., Ortega, C., Dubland, J.A., and Francis, G.A. (2019). Pathways of smooth muscle foam cell formation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* *30*, 117–124.
- Puckey, L.H., Lawn, R.M., and Knight, B.L. (1997). Polymorphisms in the apolipoprotein(a) gene and their relationship to allele size and plasma lipoprotein(a) concentration. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1099–1107.
- Purnell, J.Q., Marcovina, S.M., Hokanson, J.E., Kennedy, H., Cleary, P.A., Steffes, M.W., and Brunzell, J.D. (1995). Levels of lipoprotein(a), apolipoprotein B, and

lipoprotein cholesterol distribution in IDDM. Results from follow-up in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 44, 1218–1226.

## R

- Raal, F.J., Giugliano, R.P., Sabatine, M.S., Koren, M.J., Langslet, G., Bays, H., Blom, D., Eriksson, M., Dent, R., Wasserman, S.M., et al. (2014). Reduction in lipoprotein(a) with PCSK9 monoclonal antibody evolocumab (AMG 145): a pooled analysis of more than 1,300 patients in 4 phase II trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 1278–1288.
- Raal, F.J., Giugliano, R.P., Sabatine, M.S., Koren, M.J., Blom, D., Seidah, N.G., Honarpour, N., Lira, A., Xue, A., Chiruvolu, P., et al. (2016). PCSK9 inhibition-mediated reduction in Lp(a) with evolocumab: an analysis of 10 clinical trials and the LDL receptor's role. *J. Lipid Res.* 57, 1086–1096.
- Rader, D.J., Cain, W., Zech, L.A., Usher, D., and Brewer, H.B. (1993). Variation in lipoprotein(a) concentrations among individuals with the same apolipoprotein (a) isoform is determined by the rate of lipoprotein(a) production. *J. Clin. Invest.* 91, 443–447.
- Rader, D.J., Cain, W., Ikewaki, K., Talley, G., Zech, L.A., Usher, D., and Brewer, H.B. (1994). The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J. Clin. Invest.* 93, 2758–2763.
- Rader, D.J., Mann, W.A., Cain, W., Kraft, H.G., Usher, D., Zech, L.A., Hoeg, J.M., Davignon, J., Lupien, P., and Grossman, M. (1995). The low density lipoprotein receptor is not required for normal catabolism of Lp(a) in humans. *J. Clin. Invest.* 95, 1403–1408.
- Rainwater, D.L., and Haffner, S.M. (1998). Insulin and 2-hour glucose levels are inversely related to Lp(a) concentrations controlled for LPA genotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1335–1341.
- Rall, S.C., Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. (1982). Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4696–4700.
- Ramharack, R., Barkalow, D., and Spahr, M.A. (1998). Dominant negative effect of TGF-beta1 and TNF-alpha on basal and IL-6-induced lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) mRNA expression in primary monkey hepatocyte cultures. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 984–990.
- Ramin-Mangata, S., Blanchard, V., and Lambert, G. (2018). Key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL lowering. *Curr. Opin. Lipidol.*
- Rand, M.L., Sangrar, W., Hancock, M.A., Taylor, D.M., Marcovina, S.M., Packham, M.A., and Koschinsky, M.L. (1998). Apolipoprotein(a) enhances platelet responses to

- the thrombin receptor-activating peptide SFLLRN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *18*, 1393–1399.
- Ray, K.K., Landmesser, U., Leiter, L.A., Kallend, D., Dufour, R., Karakas, M., Hall, T., Troquay, R.P.T., Turner, T., Visseren, F.L.J., et al. (2017). Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* *376*, 1430–1440.
  - Ray, K.K., Stoekenbroek, R.M., Kallend, D., Leiter, L.A., Landmesser, U., Wright, R.S., Wijngaard, P., and Kastelein, J.J.P. (2018). Effect of an siRNA Therapeutic Targeting PCSK9 on Atherogenic Lipoproteins: Prespecified Secondary End Points in ORION 1. *Circulation* *138*, 1304–1316.
  - Ray, K.K., Corral, P., Morales, E., and Nicholls, S.J. (2019). Pharmacological lipid-modification therapies for prevention of ischaemic heart disease: current and future options. *The Lancet* *394*, 697–708.
  - Reyes-Soffer, G., Pavlyha, M., Ngai, C., Thomas, T., Holleran, S., Ramakrishnan, R., Karmally, W., Nandakumar, R., Fontanez, N., Obunike, J., et al. (2017). Effects of PCSK9 Inhibition With Alirocumab on Lipoprotein Metabolism in Healthy Humans. *Circulation* *135*, 352–362.
  - Rhoads, G.G., Dahlen, G., Berg, K., Morton, N.E., and Dannenberg, A.L. (1986). Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA* *256*, 2540–2544.
  - Riches, K., Franklin, L., Maqbool, A., Peckham, M., Adams, M., Bond, J., Warburton, P., Feric, N.T., Koschinsky, M.L., O'Regan, D.J., et al. (2013). Apolipoprotein(a) acts as a chemorepellent to human vascular smooth muscle cells via integrin  $\alpha V\beta 3$  and RhoA/ROCK-mediated mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1776–1783.
  - Ridker, P.M., Hennekens, C.H., and Stampfer, M.J. (1993). A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* *270*, 2195–2199.
  - Romagnuolo, R., Scipione, C.A., Boffa, M.B., Marcovina, S.M., Seidah, N.G., and Koschinsky, M.L. (2015). Lipoprotein(a) catabolism is regulated by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 through the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* *290*, 11649–11662.
  - Romagnuolo, R., Scipione, C.A., Marcovina, S.M., Gemin, M., Seidah, N.G., Boffa, M.B., and Koschinsky, M.L. (2017). Roles of the low density lipoprotein receptor and related receptors in inhibition of lipoprotein(a) internalization by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *PLoS ONE* *12*, e0180869.
  - Romagnuolo, R., DeMarco, K., Scipione, C.A., Boffa, M.B., and Koschinsky, M.L. (2018). Apolipoprotein(a) inhibits the conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the surface of vascular endothelial and smooth muscle cells. *Thromb. Res.* *169*, 1–7.
  - Rosenson, R.S., Brewer, H.B., Davidson, W.S., Fayad, Z.A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X.-C., Phillips, M.C., Rader, D.J., et al. (2012). Cholesterol efflux

and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* 125, 1905–1919.

- Rye, K.-A., and Barter, P.J. (2014). Cardioprotective functions of HDLs. *J. Lipid Res.* 55, 168–179.

## S

- Sabatine, M.S., Giugliano, R.P., Wiviott, S.D., Raal, F.J., Blom, D.J., Robinson, J., Ballantyne, C.M., Somaratne, R., Legg, J., Wasserman, S.M., et al. (2015). Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 372, 1500–1509.
- Sabatine, M.S., Giugliano, R.P., Keech, A.C., Honarpour, N., Wiviott, S.D., Murphy, S.A., Kuder, J.F., Wang, H., Liu, T., Wasserman, S.M., et al. (2017). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* 376, 1713–1722.
- Saleheen, D., Haycock, P.C., Zhao, W., Rasheed, A., Taleb, A., Imran, A., Abbas, S., Majeed, F., Akhtar, S., Qamar, N., et al. (2017). Apolipoprotein(a) isoform size, lipoprotein(a) concentration, and coronary artery disease: a mendelian randomisation analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5, 524–533.
- Sandholzer, C., Hallman, D.M., Saha, N., Sigurdsson, G., Lackner, C., Császár, A., Boerwinkle, E., and Utermann, G. (1991). Effects of the apolipoprotein(a) size polymorphism on the lipoprotein(a) concentration in 7 ethnic groups. *Hum. Genet.* 86, 607–614.
- Sandholzer, C., Boerwinkle, E., Saha, N., Tong, M.C., and Utermann, G. (1992). Apolipoprotein(a) phenotypes, Lp(a) concentration and plasma lipid levels in relation to coronary heart disease in a Chinese population: evidence for the role of the apo(a) gene in coronary heart disease. *J. Clin. Invest.* 89, 1040–1046.
- Sangrar, W., Marcovina, S.M., and Koschinsky, M.L. (1994). Expression and characterization of apolipoprotein(a) kringle IV types 1, 2 and 10 in mammalian cells. *Protein Eng.* 7, 723–731.
- Santos, R.D., Raal, F.J., Catapano, A.L., Witztum, J.L., Steinhagen-Thiessen, E., and Tsimikas, S. (2015). Mipomersen, an antisense oligonucleotide to apolipoprotein B-100, reduces lipoprotein(a) in various populations with hypercholesterolemia: results of 4 phase III trials. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 689–699.
- Schaefer, E.J., Gregg, R.E., Ghiselli, G., Forte, T.M., Ordovas, J.M., Zech, L.A., and Brewer, H.B. (1986). Familial apolipoprotein E deficiency. *J. Clin. Invest.* 78, 1206–1219.
- Schaefer, E.J., Lamon-Fava, S., Johnson, S., Ordovas, J.M., Schaefer, M.M., Castelli, W.P., and Wilson, P.W. (1994). Effects of gender and menopausal status on the

- association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler. Thromb. 14*, 1105–1113.
- Scharnagl, H., Stojakovic, T., Dieplinger, B., Dieplinger, H., Erhart, G., Kostner, G.M., Herrmann, M., März, W., and Grammer, T.B. (2019). Comparison of lipoprotein (a) serum concentrations measured by six commercially available immunoassays. *Atherosclerosis 289*, 206–213.
  - Schlegel, W., Petersdorf, L.I., Junker, R., Schulte, H., Ebert, C., and Von Eckardstein, A. (1999). The effects of six months of treatment with a low-dose of conjugated oestrogens in menopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf) 51*, 643–651.
  - Schmidt, K., Kraft, H.G., Parson, W., and Utermann, G. (2006). Genetics of the Lp(a)/apo(a) system in an autochthonous Black African population from the Gabon. *Eur. J. Hum. Genet. 14*, 190–201.
  - Schnitzler, J.G., Hoogeveen, R.M., Ali, L., Prange, K.H., Waissi, F., van Weeghel, M., Bachmann, J.C., Versloot, M., Borrelli, M.J., Yeang, C., et al. (2020). Atherogenic Lipoprotein(a) Increases Vascular Glycolysis, Thereby Facilitating Inflammation and Leukocyte Extravasation. *Circ. Res.*
  - Schwartz, G.G., Steg, P.G., Szarek, M., Bhatt, D.L., Bittner, V.A., Diaz, R., Edelberg, J.M., Goodman, S.G., Hanotin, C., Harrington, R.A., et al. (2018). Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *New England Journal of Medicine 379*, 2097–2107.
  - Scipione, C.A., Sayegh, S.E., Romagnuolo, R., Tsimikas, S., Marcovina, S.M., Boffa, M.B., and Koschinsky, M.L. (2015). Mechanistic insights into Lp(a)-induced IL-8 expression: a role for oxidized phospholipid modification of apo(a). *J. Lipid Res. 56*, 2273–2285.
  - Sechi, L.A., Zingaro, L., De Carli, S., Sechi, G., Catena, C., Falletti, E., Dell’Anna, E., and Bartoli, E. (1998). Increased serum lipoprotein(a) levels in patients with early renal failure. *Ann. Intern. Med. 129*, 457–461.
  - Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S.B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100*, 928–933.
  - Seimon, T.A., Nadolski, M.J., Liao, X., Magallon, J., Nguyen, M., Feric, N.T., Koschinsky, M.L., Harkewicz, R., Witztum, J.L., Tsimikas, S., et al. (2010). Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab. 12*, 467–482.
  - Senn, S. (2006). Change from baseline and analysis of covariance revisited. *Stat Med 25*, 4334–4344.

- Shapiro, M.D., Minnier, J., Tavori, H., Kassahun, H., Flower, A., Somaratne, R., and Fazio, S. (2019). Relationship Between Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Lipoprotein(a) Lowering in Response to PCSK9 Inhibition With Evolocumab. *J Am Heart Assoc* 8, e010932.
- Sharma, M., Von Zychlinski-Kleffmann, A., Porteous, C.M., Jones, G.T., Williams, M.J.A., and McCormick, S.P.A. (2015). Lipoprotein (a) upregulates ABCA1 in liver cells via scavenger receptor-B1 through its oxidized phospholipids. *J. Lipid Res.* 56, 1318–1328.
- Sharma, M., Redpath, G.M., Williams, M.J.A., and McCormick, S.P.A. (2017). Recycling of Apolipoprotein(a) After PlgRKT-Mediated Endocytosis of Lipoprotein(a). *Circ. Res.* 120, 1091–1102.
- Shore, V.G., and Shore, B. (1973). Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12, 502–507.
- Smelt, A.H.M., and de Beer, F. (2004). Apolipoprotein E and familial dysbetalipoproteinemia: clinical, biochemical, and genetic aspects. *Semin Vasc Med* 4, 249–257.
- Sniderman, A.D., de Graaf, J., Thanassoulis, G., Tremblay, A.J., Martin, S.S., and Couture, P. (2018). The spectrum of type III hyperlipoproteinemia. *J Clin Lipidol* 12, 1383–1389.
- Srinivasan, S.R., Dahlen, G.H., Jarpa, R.A., Webber, L.S., and Berenson, G.S. (1991). Racial (black-white) differences in serum lipoprotein (a) distribution and its relation to parental myocardial infarction in children. Bogalusa Heart Study. *Circulation* 84, 160–167.
- Stefanutti, C., Blom, D.J., Aversa, M.R., Meagher, E.A., Theron, H. dT, Marais, A.D., Hegele, R.A., Sirtori, C.R., Shah, P.K., Gaudet, D., et al. (2015). The lipid-lowering effects of lomitapide are unaffected by adjunctive apheresis in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia - a post-hoc analysis of a Phase 3, single-arm, open-label trial. *Atherosclerosis* 240, 408–414.
- Stein, E.A. (2003). The power of statins: aggressive lipid lowering. *Clin Cardiol* 26, III25-31.
- Stein, E.A., Mellis, S., Yancopoulos, G.D., Stahl, N., Logan, D., Smith, W.B., Lisbon, E., Gutierrez, M., Webb, C., Wu, R., et al. (2012). Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 366, 1108–1118.
- Stenvinkel, P., Berglund, L., Heimbürger, O., Pettersson, E., and Alvestrand, A. (1993). Lipoprotein(a) in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 44, 1116–1123.

- Stewart, B.F., Siscovick, D., Lind, B.K., Gardin, J.M., Gottdiener, J.S., Smith, V.E., Kitzman, D.W., and Otto, C.M. (1997). Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *Cardiovascular Health Study. J. Am. Coll. Cardiol.* 29, 630–634.
- Stiekema, L.C.A., Prange, K.H.M., Hoogeveen, R.M., Verweij, S.L., Kroon, J., Schnitzler, J.G., Dzobo, K.E., Cupido, A.J., Tsimikas, S., Stroes, E.S.G., et al. (2020). Potent lipoprotein(a) lowering following apolipoprotein(a) antisense treatment reduces the pro-inflammatory activation of circulating monocytes in patients with elevated lipoprotein(a). *Eur. Heart J.*
- Stoekenbroek, R.M., Lambert, G., Cariou, B., and Hovingh, G.K. (2019). Inhibiting PCSK9 — biology beyond LDL control. *Nature Reviews Endocrinology* 15, 52–62.
- Su, W., Campos, H., Judge, H., Walsh, B.W., and Sacks, F.M. (1998). Metabolism of Apo(a) and ApoB100 of lipoprotein(a) in women: effect of postmenopausal estrogen replacement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3267–3276.
- Sullivan, D., Olsson, A.G., Scott, R., Kim, J.B., Xue, A., GebSKI, V., Wasserman, S.M., and Stein, E.A. (2012). Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on low-density lipoprotein cholesterol levels in statin-intolerant patients: the GAUSS randomized trial. *JAMA* 308, 2497–2506.
- Suzuki, K., Kuriyama, M., Saito, T., and Ichinose, A. (1997). Plasma lipoprotein(a) levels and expression of the apolipoprotein(a) gene are dependent on the nucleotide polymorphisms in its 5'-flanking region. *J. Clin. Invest.* 99, 1361–1366.

## T

- Tabas, I., and Bornfeldt, K.E. (2016). Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118, 653–667.
- Tada, H., Kawashiri, M.-A., Yoshida, T., Teramoto, R., Nohara, A., Konno, T., Inazu, A., Mabuchi, H., Yamagishi, M., and Hayashi, K. (2016). Lipoprotein(a) in Familial Hypercholesterolemia With Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Gain-of-Function Mutations. *Circ. J.* 80, 512–518.
- Tam, S.P., Zhang, X., and Koschinsky, M.L. (1996). Interaction of a recombinant form of apolipoprotein[a] with human fibroblasts and with the human hepatoma cell line HepG2. *J. Lipid Res.* 37, 518–533.
- Tate, J.R., Rifai, N., Berg, K., Couderc, R., Dati, F., Kostner, G.M., Sakurabayashi, I., and Steinmetz, A. (1998). International Federation of Clinical Chemistry standardization project for the measurement of lipoprotein(a). Phase I. Evaluation of the analytical performance of lipoprotein(a) assay systems and commercial calibrators. *Clin. Chem.* 44, 1629–1640.

- Tavori, H., Christian, D., Minnier, J., Plubell, D., Shapiro, M.D., Yeang, C., Giunzioni, I., Croyal, M., Duell, P.B., Lambert, G., et al. (2016a). PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ. Res.* *119*, 29–35.
- Tavori, H., Giunzioni, I., Predazzi, I.M., Plubell, D., Shivinsky, A., Miles, J., Devay, R.M., Liang, H., Rashid, S., Linton, M.F., et al. (2016b). Human PCSK9 promotes hepatic lipogenesis and atherosclerosis development via apoE- and LDLR-mediated mechanisms. *Cardiovasc. Res.* *110*, 268–278.
- Tavori, H., Fenton, A.M., Plubell, D.L., Rosario, S., Yerkes, E., Gasik, R., Miles, J., Bergstrom, P., Minnier, J., Fazio, S., et al. (2019). Elevated Lipoprotein(a) Levels Lower ABCA1 Cholesterol Efflux Capacity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *104*, 4793–4803.
- Thanassoulis, G. (2016). Lipoprotein (a) in calcific aortic valve disease: from genomics to novel drug target for aortic stenosis. *J. Lipid Res.* *57*, 917–924.
- Thanassoulis, G., Campbell, C.Y., Owens, D.S., Smith, J.G., Smith, A.V., Peloso, G.M., Kerr, K.F., Pechlivanis, S., Budoff, M.J., Harris, T.B., et al. (2013). Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* *368*, 503–512.
- Thedrez, A., Blom, D.J., Ramin-Mangata, S., Blanchard, V., Croyal, M., Chemello, K., Nativel, B., Pichelin, M., Cariou, B., Bourane, S., et al. (2018). Homozygous Familial Hypercholesterolemia Patients With Identical Mutations Variably Express the LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor): Implications for the Efficacy of Evolocumab. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *38*, 592–598.
- Thomas, T., Zhou, H., Karmally, W., Ramakrishnan, R., Holleran, S., Liu, Y., Jumes, P., Wagner, J.A., Hubbard, B., Previs, S.F., et al. (2017). CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) Inhibition With Anacetrapib Decreases Production of Lipoprotein(a) in Mildly Hypercholesterolemic Subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *37*, 1770–1775.
- Tran-Dinh, A., Diallo, D., Delbosc, S., Varela-Perez, L.M., Dang, Q.B., Lapergue, B., Burillo, E., Michel, J.B., Levoye, A., Martin-Ventura, J.L., et al. (2013). HDL and endothelial protection. *Br. J. Pharmacol.* *169*, 493–511.
- Trommsdorff, M., Köchl, S., Lingenhel, A., Kronenberg, F., Delpont, R., Vermaak, H., Lemming, L., Klausen, I.C., Faergeman, O., and Utermann, G. (1995). A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma concentrations in Caucasians. *J. Clin. Invest.* *96*, 150–157.
- Tselmin, S., Müller, G., Schatz, U., Julius, U., Bornstein, S.R., and Hohenstein, B. (2017). Kinetics of Lipoprotein(a) in patients undergoing weekly lipoprotein apheresis for Lp(a) hyperlipoproteinemia. *Atheroscler Suppl* *30*, 209–216.
- Tsimikas, S. (2016). Lipoprotein(a): novel target and emergence of novel therapies to lower cardiovascular disease risk. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* *23*, 157–164.

- Tsimikas, S. (2017). A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies. *J. Am. Coll. Cardiol.* *69*, 692–711.
- Tsimikas, S., Bergmark, C., Beyer, R.W., Patel, R., Pattison, J., Miller, E., Juliano, J., and Witztum, J.L. (2003). Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* *41*, 360–370.
- Tsimikas, S., Witztum, J.L., Miller, E.R., Sasiela, W.J., Szarek, M., Olsson, A.G., Schwartz, G.G., and Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators (2004). High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial. *Circulation* *110*, 1406–1412.
- Tsimikas, S., Brilakis, E.S., Miller, E.R., McConnell, J.P., Lennon, R.J., Kornman, K.S., Witztum, J.L., and Berger, P.B. (2005). Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* *353*, 46–57.
- Tsimikas, S., Mallat, Z., Talmud, P.J., Kastelein, J.J.P., Wareham, N.J., Sandhu, M.S., Miller, E.R., Benessiano, J., Tedgui, A., Witztum, J.L., et al. (2010). Oxidation-specific biomarkers, lipoprotein(a), and risk of fatal and nonfatal coronary events. *J. Am. Coll. Cardiol.* *56*, 946–955.
- Tsimikas, S., Duff, G.W., Berger, P.B., Rogus, J., Huttner, K., Clopton, P., Brilakis, E., Kornman, K.S., and Witztum, J.L. (2014). 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.
- Tsimikas, S., Viney, N.J., Hughes, S.G., Singleton, W., Graham, M.J., Baker, B.F., Burkey, J.L., Yang, Q., Marcovina, S.M., Geary, R.S., et al. (2015). Antisense therapy targeting apolipoprotein(a): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 study. *Lancet* *386*, 1472–1483.
- Tsimikas, S., Fazio, S., Ferdinand, K.C., Ginsberg, H.N., Koschinsky, M.L., Marcovina, S.M., Moriarty, P.M., Rader, D.J., Remaley, A.T., Reyes-Soffer, G., et al. (2018). NHLBI Working Group Recommendations to Reduce Lipoprotein(a)-Mediated Risk of Cardiovascular Disease and Aortic Stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* *71*, 177–192.
- Tsimikas, S., Gordts, P.L.S.M., Nora, C., Yeang, C., and Witztum, J.L. (2019). Statin therapy increases lipoprotein(a) levels. *Eur. Heart J.*
- Tsimikas, S., Karwatowska-Prokopczuk, E., Gouni-Berthold, I., Tardif, J.-C., Baum, S.J., Steinhagen-Thiessen, E., Shapiro, M.D., Stroes, E.S., Moriarty, P.M., Nordestgaard, B.G., et al. (2020). Lipoprotein(a) Reduction in Persons with Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* *382*, 244–255.
- Tsironis, L.D., Mitsios, J.V., Milionis, H.J., Elisaf, M., and Tselepis, A.D. (2004a). Effect of lipoprotein (a) on platelet activation induced by platelet-activating factor: role

of apolipoprotein (a) and endogenous PAF-acetylhydrolase. *Cardiovasc. Res.* *63*, 130–138.

- Tsironis, L.D., Katsouras, C.S., Lourida, E.S., Mitsios, J.V., Goudevenos, J., Elisaf, M., and Tselepis, A.D. (2004b). Reduced PAF-acetylhydrolase activity associated with Lp(a) in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* *177*, 193–201.

## U-V

- Utermann, G. (1975). Isolation and partial characterization of an arginine-rich apolipoprotein from human plasma very-low-density lipoproteins: apolipoprotein E. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* *356*, 1113–1121.
- Utermann, G., Menzel, H.J., Kraft, H.G., Duba, H.C., Kemmler, H.G., and Seitz, C. (1987). Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J. Clin. Invest.* *80*, 458–465.
- van der Valk, F.M., Bekkering, S., Kroon, J., Yeang, C., Van den Bossche, J., van Buul, J.D., Ravandi, A., Nederveen, A.J., Verberne, H.J., Scipione, C., et al. (2016). Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans. *Circulation* *134*, 611–624.
- Varret, M., Rabès, J.P., Saint-Jore, B., Cenarro, A., Marinoni, J.C., Civeira, F., Devillers, M., Krempf, M., Coulon, M., Thiart, R., et al. (1999). A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 1378–1387.
- Varvel, S., McConnell, J.P., and Tsimikas, S. (2016). Prevalence of Elevated Lp(a) Mass Levels and Patient Thresholds in 532 359 Patients in the United States. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *36*, 2239–2245.
- Villard, E.F., Thedrez, A., Blankenstein, J., Croyal, M., Tran, T.-T.-T., Poirier, B., Le Bail, J.-C., Illiano, S., Nobécourt, E., Krempf, M., et al. (2016). PCSK9 Modulates the Secretion But Not the Cellular Uptake of Lipoprotein(a) Ex Vivo: An Effect Blunted by Alirocumab. *JACC Basic Transl Sci* *1*, 419–427.
- Viney, N.J., van Capelleveen, J.C., Geary, R.S., Xia, S., Tami, J.A., Yu, R.Z., Marcovina, S.M., Hughes, S.G., Graham, M.J., Crooke, R.M., et al. (2016). Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. *Lancet* *388*, 2239–2253.
- Virani, S.S., Brautbar, A., Davis, B.C., Nambi, V., Hoogeveen, R.C., Sharrett, A.R., Coresh, J., Mosley, T.H., Morrisett, J.D., Catellier, D.J., et al. (2012). Associations between lipoprotein(a) levels and cardiovascular outcomes in black and white subjects: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* *125*, 241–249.

- Vogt, A. (2017). Hyperlipoproteinaemia(a) - apheresis and emerging therapies. *Clin Res Cardiol Suppl* 12, 12–17.
- Vuorio, A., Watts, G.F., and Kovanen, P.T. (2017). Depicting new pharmacological strategies for familial hypercholesterolaemia involving lipoprotein (a). *Eur. Heart J.* 38, 3555–3559.

## W

- Wade, D.P., Clarke, J.G., Lindahl, G.E., Liu, A.C., Zysow, B.R., Meer, K., Schwartz, K., and Lawn, R.M. (1993). 5' control regions of the apolipoprotein(a) gene and members of the related plasminogen gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1369–1373.
- Wade, D.P., Lindahl, G.E., and Lawn, R.M. (1994). Apolipoprotein(a) gene transcription is regulated by liver-enriched trans-acting factor hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *J. Biol. Chem.* 269, 19757–19765.
- Walmsley, S.J., Rudnick, P.A., Liang, Y., Dong, Q., Stein, S.E., and Nesvizhskii, A.I. (2013). Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics. *J. Proteome Res.* 12, 5666–5680.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., and Tall, A.R. (1998). Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 273, 32920–32926.
- Wanner, C., Rader, D., Bartens, W., Krämer, J., Brewer, H.B., Schollmeyer, P., and Wieland, H. (1993). Elevated plasma lipoprotein(a) in patients with the nephrotic syndrome. *Ann. Intern. Med.* 119, 263–269.
- Ward, N.C., Watts, G.F., and Eckel, R.H. (2019). Statin Toxicity. *Circ. Res.* 124, 328–350.
- Watts, G.F., Chan, D.C., Somaratne, R., Wasserman, S.M., Scott, R., Marcovina, S.M., and Barrett, P.H.R. (2018). Controlled study of the effect of proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 inhibition with evolocumab on lipoprotein(a) particle kinetics. *Eur. Heart J.* 39, 2577–2585.
- Watts, G.F., Chan, D.C., Pang, J., Ma, L., Ying, Q., Aggarwal, S., Marcovina, S.M., and Barrett, P.H.R. (2020). PCSK9 Inhibition with alirocumab increases the catabolism of lipoprotein(a) particles in statin-treated patients with elevated lipoprotein(a). *Metab. Clin. Exp.* 154221.
- Weber, C., and Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* 17, 1410–1422.

- Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. (1982). Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J. Biol. Chem.* 257, 2518–2521.
- Werner, E. (2011). Analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse : application à la recherche de biomarqueurs indirects d'induction enzymatique. phdthesis. Université Paris Sud - Paris XI.
- White, A.L., and Lanford, R.E. (1994). Cell surface assembly of lipoprotein(a) in primary cultures of baboon hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 28716–28723.
- White, A.L., Rainwater, D.L., and Lanford, R.E. (1993). Intracellular maturation of apolipoprotein[a] and assembly of lipoprotein[a] in primary baboon hepatocytes. *J. Lipid Res.* 34, 509–517.
- White, A.L., Rainwater, D.L., Hixson, J.E., Estlack, L.E., and Lanford, R.E. (1994). Intracellular processing of apo(a) in primary baboon hepatocytes. *Chem. Phys. Lipids* 67–68, 123–133.
- White, A.L., Guerra, B., and Lanford, R.E. (1997). Influence of allelic variation on apolipoprotein(a) folding in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272, 5048–5055.
- Willeit, P., Ridker, P.M., Nestel, P.J., Simes, J., Tonkin, A.M., Pedersen, T.R., Schwartz, G.G., Olsson, A.G., Colhoun, H.M., Kronenberg, F., et al. (2018). Baseline and on-statin treatment lipoprotein(a) levels for prediction of cardiovascular events: individual patient-data meta-analysis of statin outcome trials. *Lancet* 392, 1311–1320.
- Williams-Blangero, S., and Rainwater, D.L. (1991). Variation in Lp(a) levels and apo(a) isoform frequencies in five baboon subspecies. *Hum. Biol.* 63, 65–76.
- Wilson, D.P., Jacobson, T.A., Jones, P.H., Koschinsky, M.L., McNeal, C.J., Nordestgaard, B.G., and Orringer, C.E. (2019). Use of Lipoprotein(a) in clinical practice: A biomarker whose time has come. A scientific statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol* 13, 374–392.
- Witztum, J.L., and Ginsberg, H.N. (2016). Lipoprotein (a): Coming of Age at Last. *J Lipid Res* 57, 336–339.

## Y

- Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T.R., Liu, C.-C., and Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* 15, 501–518.
- Yang, X., Sethi, A., Yanek, L.R., Knapper, C., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A., Becker, D.M., Mathias, R.A., Remaley, A.T., and Becker, L.C. (2016). SCARB1 Gene Variants Are Associated With the Phenotype of Combined High High-Density Lipoprotein Cholesterol and High Lipoprotein (a). *Circ Cardiovasc Genet* 9, 408–418.

- Yang, X.-P., Amar, M.J., Vaisman, B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Freeman, L.A., Kurlander, R.J., Patterson, A.P., Becker, L.C., and Remaley, A.T. (2013). Scavenger receptor-BI is a receptor for lipoprotein(a). *J. Lipid Res.* *54*, 2450–2457.
- Yassine, H., Borges, C.R., Schaab, M.R., Billheimer, D., Stump, C., Reaven, P., Lau, S.S., and Nelson, R. (2013). Mass spectrometric immunoassay and MRM as targeted MS-based quantitative approaches in biomarker development: potential applications to cardiovascular disease and diabetes. *Proteomics Clin Appl* *7*, 528–540.
- Yates, J.R. (1998). Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom* *33*, 1–19.
- Ye, Z., Haycock, P.C., Gurdasani, D., Pomilla, C., Boekholdt, S.M., Tsimikas, S., Khaw, K.-T., Wareham, N.J., Sandhu, M.S., and Forouhi, N.G. (2014). The association between circulating lipoprotein(a) and type 2 diabetes: is it causal? *Diabetes* *63*, 332–342.
- Yeang, C., Hung, M.-Y., Byun, Y.-S., Clopton, P., Yang, X., Witztum, J.L., and Tsimikas, S. (2016). Effect of therapeutic interventions on oxidized phospholipids on apolipoprotein B100 and lipoprotein(a). *J Clin Lipidol* *10*, 594–603.
- Yeang, C., Gordts, P.L.S.M., and Tsimikas, S. (2017). Novel Lipoprotein(a) Catabolism Pathway via Apolipoprotein(a) Recycling: Adding the Plasminogen Receptor PlgRKT to the List. *Circ. Res.* *120*, 1050–1052.
- Yoshida, H., Shoda, T., Yanai, H., Ikewaki, K., Kurata, H., Ito, K., Furutani, N., Tada, N., Witztum, J.L., and Tsimikas, S. (2013). Effects of pitavastatin and atorvastatin on lipoprotein oxidation biomarkers in patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis* *226*, 161–164.
- Yoshida, T., Gan, Q., and Owens, G.K. (2008). Kruppel-like factor 4, Elk-1, and histone deacetylases cooperatively suppress smooth muscle cell differentiation markers in response to oxidized phospholipids. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *295*, C1175-1182.
- Yu, B., Hafiane, A., Thanassoulis, G., Ott, L., Filwood, N., Cerruti, M., Gourgas, O., Shum-Tim, D., Al Kindi, H., de Varennes, B., et al. (2017). Lipoprotein(a) Induces Human Aortic Valve Interstitial Cell Calcification. *JACC Basic Transl Sci* *2*, 358–371.
- Yutzey, K.E., Demer, L.L., Body, S.C., Huggins, G.S., Towler, D.A., Giachelli, C.M., Hofmann-Bowman, M.A., Mortlock, D.P., Rogers, M.B., Sadeghi, M.M., et al. (2014). Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 2387–2393.

## Z

- Zaiou, M., Arnold, K.S., Newhouse, Y.M., Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Segall, M.L., Phillips, M.C., and Lund-Katz, S. (2000). Apolipoprotein E–low density

- lipoprotein receptor interaction: influences of basic residue and amphipathic  $\alpha$ -helix organization in the ligand. *J. Lipid Res.* *41*, 1087–1095.
- Zeng, L., Mirza-Schreiber, N., Lamina, C., Coassin, S., Nelson, C.P., Franzén, O., Kleber, M.E., Mack, S., Andlauer, T.F.M., Jiang, B., et al. (2019). Cis-epistasis at the LPA locus and risk of coronary artery disease. *BioRxiv* 518290.
  - Zheng, K.H., Tsimikas, S., Pawade, T., Kroon, J., Jenkins, W.S.A., Doris, M.K., White, A.C., Timmers, N.K.L.M., Hjortnaes, J., Rogers, M.A., et al. (2019). Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* *73*, 2150–2162.
  - von Zychlinski, A., Kleffmann, T., Williams, M.J.A., and McCormick, S.P. (2011). Proteomics of Lipoprotein(a) identifies a protein complement associated with response to wounding. *J Proteomics* *74*, 2881–2891.
  - von Zychlinski, A., Williams, M., McCormick, S., and Kleffmann, T. (2014). Absolute quantification of apolipoproteins and associated proteins on human plasma lipoproteins. *J Proteomics* *106*, 181–190.
  - Zysow, B.R., Lindahl, G.E., Wade, D.P., Knight, B.L., and Lawn, R.M. (1995). C/T polymorphism in the 5' untranslated region of the apolipoprotein(a) gene introduces an upstream ATG and reduces in vitro translation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *15*, 58–64.

**REVUES ET  
TRAVAUX COLLABORATIFS**

# Revue

Pathology (February 2019) 51(2), pp. 177–183

## LIPIDS AND CARDIOVASCULAR DISEASE

### PCSK9: from biology to clinical applications

VALENTIN BLANCHARD<sup>1</sup>, ILYA KHANTALIN<sup>1,2</sup>, STÉPHANE RAMIN-MANGATA<sup>1</sup>,  
KÉVIN CHÉMELLO<sup>1</sup>, BRICE NATIVEL<sup>1</sup>, GILLES LAMBERT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Inserm UMR 1188 DÉTROI, Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, France;

<sup>2</sup>CHU de La Réunion, Service de Chirurgie Vasculaire, Saint-Denis, France



#### Summary

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is a crucial protein governing the circulating levels of low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), by virtue of its pivotal role in the degradation of the LDL receptor (LDLR). In the last 15 years, *in vitro* and *in vivo* studies have allowed our understanding of the physiological role of PCSK9. In the current report, we review the key studies that have established the mode of action of PCSK9, leading to the development of PCSK9 inhibitors for clinical use. Data from clinical trials investigating these therapies clearly and unambiguously demonstrate the safety and efficacy of these new drugs that have the power to dramatically reduce LDL-C and associated cardiovascular diseases.

**Key words:** PCSK9; LDL receptor; PCSK9 inhibitors; cardiovascular disease.

**Abbreviations:** apoB, apolipoprotein B; ACS, acute coronary syndrome; ASO, antisense oligonucleotide; CAD, coronary artery disease; CVD, cardiovascular disease; ER, endoplasmic reticulum; FH, familial hypercholesterolaemia; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; LDL, low density lipoprotein; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; LDLR, low density lipoprotein receptor; LNA, locked nucleic acid; mAb, monoclonal antibody; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; siRNA, small interfering ribonucleic acid; SREBP, sterol regulatory element-binding proteins.

Received 11 September, revised 3 October, accepted 3 October 2018  
Available online 4 December 2018

#### INTRODUCTION

Familial hypercholesterolaemia (FH) is an autosomal dominant condition characterised by elevated plasma low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) levels, which are typically above the 95th percentile for age and sex. Molecular defects in the gene encoding the LDL receptor (LDLR) are identified in the vast majority of FH patients.<sup>1,2</sup> Approximately 5% of individuals with an FH phenotype carry mutations in the ligand-binding domain of apolipoprotein B (apoB), the protein component of LDL particle that interacts with the LDLR.<sup>3</sup> Fifteen years ago, genetic defects in PCSK9 were associated with the hypercholesterolaemic phenotype in less than 1% of FH families.<sup>4</sup> The unique mode of action of PCSK9 as an inhibitor of the LDLR has led to the successful development of a novel class of hypocholesterolaemic agents: the PCSK9 inhibitors. Here we review the biology of PCSK9, and the most significant pioneering preclinical

studies that have paved the way for the development of PCSK9 inhibitors in clinical trials.

#### THE BIOLOGY OF PCSK9

##### A unique protease

PCSK9 is a serine protease of the subtilase family mainly expressed in the liver and to a much lower extent in the intestine, the kidney, and the brain. It was initially thought to be involved in liver regeneration and neuronal differentiation.<sup>5</sup> PCSK9 is synthesised as a 72 kDa zymogen in the endoplasmic reticulum (ER). It undergoes autocatalytic intramolecular processing at the FAQ<sub>152</sub>↓SIP site to form a 63 kDa mature enzyme found in the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus.<sup>6,7</sup> The signal peptide (residues 1–30) and the prodomain (residues 31–152) of PCSK9, precede a catalytic domain (residues 153–425) that contains the canonical N<sub>186</sub>, H<sub>226</sub> and S<sub>386</sub> catalytic triad as well as the oxyanion hole N<sub>317</sub> residue, followed by a C-terminal domain (residues 425–692). Unlike other proprotein convertases that cleave either after basic amino acids and are related to Kexin (e.g., furin) or after hydrophobic residues such as the Site 1 protease that is related to Pyrolysin, PCSK9 is the only known proprotein convertase of this family that cleaves after non-basic amino acids and thereby is related to proteinase K. The only known substrate for PCSK9 is pro-PCSK9 itself.<sup>8</sup>

In 2003, Abifadel and colleagues identified the S<sub>127</sub>R and F<sub>216</sub>L missense mutations in the gene encoding PCSK9 in two French families with FH, previously described as not carrying a mutation in the *LDLR* or *APOB* genes.<sup>4</sup> The PCSK9-D<sub>374</sub>Y missense mutation was subsequently reported in FH patients from Utah, Norway, and the United Kingdom.<sup>9,10</sup> These mutations were later shown to be ‘gain of function’ (GOF) mutations. The prevalence of PCSK9 GOF mutations is very low (≈ 1%) compared with defects in *LDLR* (≈ 90%) and *APOB* (≈ 5%). The risk of coronary artery disease (CAD) associated with the PCSK9-D<sub>374</sub>Y variant is sharply increased, and exceeds the average risk associated with mutations in the *LDLR* gene.<sup>11,12</sup>

Large cohort studies have been undertaken to address the role of common PCSK9 sequence variations in lipid metabolism and CAD risk. In 2005, a causative association was established between two relatively common ‘loss-of-function’ (LOF) mutations in PCSK9 and low plasma LDL-C levels.<sup>13</sup> The individuals carrying these mutations (PCSK9-C<sub>679</sub>X or PCSK9-Y<sub>142</sub>X) exhibited LDL-C levels of 2.6 ± 1.1 mmol/L, compared with 3.6 ± 1.1 mmol/L for non-

REVIEW



## Key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL lowering

Stéphane Ramin-Mangata\*, Valentin Blanchard\*, and Gilles Lambert

### Purpose of review

Our primary objective is to review the most recent findings on the biology of PCSK9 and on two key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL control of great clinical relevance: the regulation of lipoprotein (a) circulating levels by PCSK9 inhibitors and the putative diabetogenic effects of these novel therapies.

### Recent findings

The reality of two distinct extracellular and intracellular pathways by which PCSK9 decreases the abundance of the LDLR at the surface of many cell types, most importantly hepatocytes, has recently been established. In contrast, the exact mechanisms by which PCSK9 inhibitors lower the circulating levels of lipoprotein (a) remain a point of major dispute. Despite strong indications from genetic studies that PCSK9 inhibition should increase diabetes risk, no such effect has been observed in clinical trials, and in-vitro and in-vivo studies do not clarify this issue.

### Summary

The trafficking pathways by which PCSK9 enhance LDLR degradation via the endolysosomal extracellular route or via the Golgi-lysosomal intracellular route remain to be fully elucidated. The mechanisms by which PCSK9 inhibitors reduce lipoprotein (a) also merit additional research efforts. The role of PCSK9 on glucose metabolism should likewise be studied in depth.

### Keywords

diabetes, LDL receptor, lipoprotein (a), PCSK9

## INTRODUCTION

PCSK9 plays a pivotal role in lipoprotein metabolism as a potent inhibitor of the LDL receptor (LDLR). Its precursor undergoes intramolecular autocatalytic cleavage and the resulting heterodimer is routed towards the secretory pathway. PCSK9 binds to the epidermal growth factor precursor homology domain of the LDLR and undergoes endocytosis together with the receptor. The affinity between the LDLR and PCSK9 increases with the acidic conditions found in endosomes, which locks the receptor in an 'open' conformation. The PCSK9/LDLR complex is subsequently degraded in the lysosome, precluding normal recycling of the LDLR to the plasma membrane (Fig. 1).

## RECENT INSIGHTS INTO PCSK9 BIOLOGY

PCSK9 gene expression is modulated by SREBP2 and HNF1 $\alpha$  transcription factors [1]. E2F1, an important transcription factor regulating cell cycle, was recently shown to trans-activate PCSK9 promoter synergistically with SREBP2 *in vitro* as well as *in vivo*. E2F1 thereby controls LDLR abundance and LDL

uptake via a positive regulation of PCSK9 gene expression [2\*]. In addition, three micro-RNAs were shown to finely tune PCSK9 expression posttranscriptionally [3].

It is well established that PCSK9 targets the LDLR for lysosomal degradation. However, the trafficking of the PCSK9/LDLR complex has not been elucidated yet. The presentation of PCSK9 to the LDLR at the cell surface was recently proposed to be mediated by heparan sulfate proteoglycans [4\*]. As a significant proportion of circulating PCSK9 is bound to LDL and appears as such to be less sensitive to furin cleavage and thereby more active [5], it remains to be seen whether heparan sulfate

Laboratoire Inserm UMR 1188, D TROI, Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, France

Correspondence to Gilles Lambert, PhD, Inserm UMR 1188, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Riviere, 97490 Sainte Clotilde, France.  
Tel: +33 262 692 437 708; fax: +33 262 262 938 237;  
e-mail: gilles.lambert@univ-reunion.fr

\*Stéphane Ramin-Mangata and Valentin Blanchard Equal contributions.

Curr Opin Lipidol 2018, 29:453-458

DOI:10.1097/MOL.0000000000000551

# Travaux collaboratifs

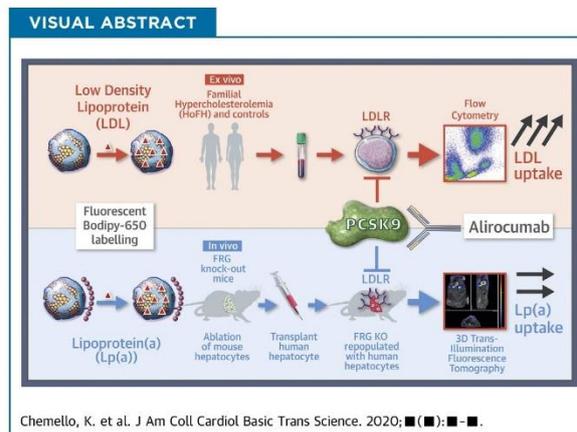
JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE  
 © 2020 THE AUTHORS. PUBLISHED BY ELSEVIER ON BEHALF OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY FOUNDATION. THIS IS AN OPEN ACCESS ARTICLE UNDER THE CC BY-NC-ND LICENSE (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

VOL. ■, NO. ■, 2020

## PRECLINICAL RESEARCH

### Lipoprotein(a) Cellular Uptake Ex Vivo and Hepatic Capture In Vivo Is Insensitive to PCSK9 Inhibition With Alirocumab

Kévin Chemello, BS,<sup>a,\*</sup> Sandra Beeské, PhD,<sup>b,\*</sup> Thi Thu Trang Tran, PhD,<sup>b</sup> Valentin Blanchard, BS,<sup>a</sup> Elise F. Villard, PhD,<sup>b</sup> Bruno Poirier, PhD,<sup>b</sup> Jean-Christophe Le Bail, PhD,<sup>b</sup> Gihad Dargazanli, PhD,<sup>b</sup> Sophie Ho-Van-Guimbal, PhD,<sup>b</sup> Denis Boulay, PhD,<sup>b</sup> Olivier Bergis, PhD,<sup>b</sup> Marie-Pierre Pruniaux, PhD,<sup>b</sup> Mikhaël Croyal, PhD,<sup>c</sup> Philip Janiak, PhD,<sup>b</sup> Etienne Guillot, PhD,<sup>b</sup> Gilles Lambert, PhD<sup>a</sup>



### HIGHLIGHTS

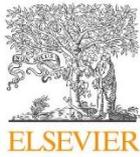
- Modulating LDL receptor expression genetically (in familial hypercholesterolemia) or pharmacologically (using statins or the PCSK9 inhibitor alirocumab) does not alter the cellular uptake of Lp(a) in primary human lymphocytes.
- Lp(a) hepatic capture is not modulated by PCSK9 inhibition with alirocumab in liver-humanized mice.
- LDLR does not appear to play a significant role in mediating Lp(a) plasma clearance in vivo.

From the <sup>a</sup>Laboratoire Inserm UMR 1188 DÉTROIT, Université de La Réunion, Sainte Clotilde, France; <sup>b</sup>Sanofi R&D, Chilly-Mazarin, France; and the <sup>c</sup>Université de Nantes, CRNH Ouest, Inra UMR 1280 PhAN, Nantes, France. The French National Project CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007). Mr. Chemello and Mr. Blanchard are recipients of scholarships from the Région Réunion and the European Union (European Regional Development Fund INTERREG V). Drs. Beeské, Tran, Villard, Poirier, Le Bail, Dargazanli, Ho-Van-Guimbal, Boulay, Bergis, Pruniaux, Janiak, and Guillot are employees of Sanofi. Dr. Lambert has received research funding and consulting fees from Amgen, Sanofi-Regeneron, Pfizer, Affiris, and Nyrada Inc. All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose. \*Mr. Chemello and Dr. Beeské contributed equally to this work and are joint first authors. The authors attest they are in compliance with human studies committees and animal welfare regulations of the authors' institutions and Food and Drug Administration guidelines, including patient consent where appropriate. For more information, visit the *JACC: Basic to Translational Science* [author instructions page](#).

Manuscript received December 26, 2019; revised manuscript received March 11, 2020, accepted March 11, 2020.

ISSN 2452-302X

<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.03.008>



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atherosclerosis](http://www.elsevier.com/locate/atherosclerosis)



Circulating PCSK9 levels are not associated with the conversion to type 2 diabetes



Stéphane Ramin-Mangata<sup>a,1</sup>, Matthieu Wargny<sup>b,c,d,1</sup>, Matthieu Pichelin<sup>b,c</sup>, Cédric Le May<sup>b</sup>, Aurélie Thédrez<sup>b</sup>, Valentin Blanchard<sup>a</sup>, Brice Nativel<sup>a</sup>, Raul D. Santos<sup>e,f,g</sup>, Isabela M. Benseor<sup>g</sup>, Paulo A. Lotufo<sup>g</sup>, Gilles Lambert<sup>a,\*,2</sup>, Bertrand Cariou<sup>b,c,\*,2</sup>

<sup>a</sup> Université La Réunion, Inserm UMR 1188 DÉTROIT, Sainte Clotilde, France

<sup>b</sup> L'Institut Du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

<sup>c</sup> L'Institut Du Thorax, Department of Endocrinology, CIC 1413 INSERM, CHU Nantes, Nantes, France

<sup>d</sup> CHU de Nantes, INSERM, CIC 1413, Pôle Hospitalo-Universitaire 11: Santé Publique, Clinique des Données, Nantes, F-44093, France

<sup>e</sup> Lipid Clinic Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School Hospital, São Paulo, Brazil

<sup>f</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

<sup>g</sup> Center of Clinical and Epidemiologic Research, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

HIGHLIGHTS

- Like statins, PCSK9 inhibitors have been proposed to increase the risk of new onset diabetes (NOD).
- We show that PCSK9 levels do not predict the transition from prediabetes to NOD.
- Inhibiting circulating PCSK9 should be safe for glucose homeostasis.

ARTICLE INFO

Keywords:

PCSK9  
PCSK9 inhibition  
New onset diabetes  
Type 2 diabetes

ABSTRACT

**Background and aims:** PCSK9 is an endogenous inhibitor of the LDL receptor pathway. Recently, Mendelian randomization studies have raised a doubt about the diabetogenic risk of PCSK9 inhibitors. Here, we assessed the relationship between plasma PCSK9 levels and the risk of new onset diabetes (NOD).

**Methods:** Fasting plasma PCSK9 levels were measured at baseline by ELISA in subjects without lipid lowering treatment in IT-DIAB (n = 233 patients with prediabetes, follow-up 5 years) and ELSA-Brasil (n = 1751; 27.5% with prediabetes, follow-up 4 years) prospective cohorts. The primary outcome in both studies was the incidence of NOD. The association of NOD with plasma PCSK9 levels was studied using multivariable Cox models.

**Results:** Plasma PCSK9 levels were not significantly associated with NOD in IT-DIAB (HR (+1SD) 0.96, CI<sub>95%</sub> [0.76; 1.21]) and ELSA-Brasil (OR (+1SD) 1.13 [0.89; 1.42]). In ELSA-Brasil, a significant positive association between PCSK9 and worsening of glucose homeostasis, including the progression from normoglycemia to prediabetes, was found (OR (+1SD) 1.17 [1.04; 1.30], p = 0.0074). Plasma PCSK9 concentration was also positively associated with the change in fasting plasma glucose between the first and second visit in ELSA-Brasil (β = 0.053, CI<sub>95%</sub> [0.006; 0.10], p = 0.026). Plasma PCSK9 levels positively correlated with total cholesterol in IT-DIAB and ELSA-Brasil, but not with glucose homeostasis parameters, except for a positive correlation with HOMA-IR in ELSA-Brasil.

**Conclusions:** Plasma PCSK9 levels were not significantly associated with NOD risk in longitudinal analyses. These data suggest that inhibition of the PCSK9 extra-cellular pathway should not be deleterious for glucose homeostasis.

\* Corresponding author. Inserm UMR 1188 DÉTROIT, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France.

\*\* Corresponding author. Clinique d'Endocrinologie, Hôpital Guillaume & René Laennec, Boulevard Jacques Monod, Saint-Herblain, 44093, Nantes Cedex 1, France.

E-mail addresses: [gilles.lambert@univ-reunion.fr](mailto:gilles.lambert@univ-reunion.fr) (G. Lambert), [bertrand.cariou@univ-nantes.fr](mailto:bertrand.cariou@univ-nantes.fr) (B. Cariou).

<sup>1</sup> These authors contributed equally as co-first authors.

<sup>2</sup> These authors contributed equally as co-last authors.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.027>

Received 24 September 2019; Received in revised form 7 November 2019; Accepted 27 November 2019

Available online 28 November 2019

0021-9150/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Research Article

# PCSK9 inhibition with alirocumab reduces lipoprotein(a) levels in nonhuman primates by lowering apolipoprotein(a) production rate

Mikaël Croyal<sup>1</sup>, Thi-Thu-Trang Tran<sup>2</sup>, Rose Hélène Blanchard<sup>3</sup>, Jean-Christophe Le Bail<sup>2</sup>, Elise F. Villard<sup>2</sup>, Bruno Poirier<sup>2</sup>, Audrey Aguessse<sup>1</sup>, Stéphanie Billon-Crossouard<sup>1</sup>, Stéphane Ramin-Mangata<sup>4</sup>, Valentin Blanchard<sup>4</sup>, Brice Nativel<sup>4</sup>, Kévin Chemello<sup>4</sup>, Ilya Khantalin<sup>4,5</sup>, Aurélie Thedrez<sup>1</sup>, Philip Janiak<sup>2</sup>, Michel Krempf<sup>1</sup>, Christophe Boixel<sup>3</sup>, Gilles Lambert<sup>4</sup> and Etienne Guillot<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université de Nantes, Laboratoire INRA UMR 1280 PhAN, Nantes, France; <sup>2</sup>Sanofi R&D, Chilly-Mazarin, France; <sup>3</sup>Sanofi R&D, Alfortville, France; <sup>4</sup>Université de La Réunion, Laboratoire Inserm UMR 1188 DÉTROI, Sainte Clotilde, France; Centre Hospitalier Universitaire de La Réunion, Service de Chirurgie Vasculaire et Thoracique, Saint Denis, France<sup>5</sup>

**Correspondance:** Gilles Lambert ([gilles.lambert@univ-reunion.fr](mailto:gilles.lambert@univ-reunion.fr))

Therapeutic antibodies targeting proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) (e.g. alirocumab) lower low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and lipoprotein (a) [Lp(a)] levels in clinical trials. We recently showed that PCSK9 enhances apolipoprotein(a) [apo(a)] secretion from primary human hepatocytes but does not affect Lp(a) cellular uptake. Here, we aimed to determine how PCSK9 neutralization modulates Lp(a) levels *in vivo*.

Six nonhuman primates (NHP) were treated with alirocumab or a control antibody (IgG1) in a crossover protocol. After the lowering of lipids reached steady state, NHP received an intravenous injection of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine, and blood samples were collected sequentially over 48 h. Enrichment of apolipoproteins in [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-leucine was assessed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). Kinetic parameters were calculated using numerical models with the SAAMII software. Compared with IgG1, alirocumab significantly reduced total cholesterol (TC) (–28%), LDL-C (–67%), Lp(a) (–56%), apolipoprotein B100 (apoB100) (–53%), and apo(a) (–53%). Alirocumab significantly increased the fractional catabolic rate of apoB100 (+29%) but not that of apo(a). Conversely, alirocumab sharply and significantly reduced the production rate (PR) of apo(a) (–42%), but not significantly that of apoB100, compared with IgG1, respectively.

In line with the observations made in human hepatocytes, the present kinetic study establishes that PCSK9 neutralization with alirocumab efficiently reduces circulating apoB100 and apo(a) levels by distinct mechanisms: apoB primarily by enhancing its catabolism and apo(a) primarily by lowering its production.

## Introduction

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

Received: 16 January 2018  
 Revised: 12 April 2018  
 Accepted: 03 May 2018

Accepted Manuscript Online:  
 03 May 2018  
 Version of Record published:  
 31 May 2018

## Translational Sciences

# Homozygous Familial Hypercholesterolemia Patients With Identical Mutations Variably Express the LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor) Implications for the Efficacy of Evolocumab

Aurélie Thedreuz, Dirk J. Blom, Stéphane Ramin-Mangata, Valentin Blanchard, Mikaël Croyal, Kévin Chemello, Brice Nativel, Matthieu Pichelin, Bertrand Cariou, Steeve Bourane, Lihua Tang, Michel Farnier, Frederick J. Raal, Gilles Lambert

**Objective**—Evolocumab, a PCSK9 (proprotein convertase subtilisin kexin type 9)–neutralizing antibody, lowers low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in homozygous familial hypercholesterolemic (HoFH) patients with reduced LDLR (low-density lipoprotein receptor) function. However, their individual responses are highly variable, even among carriers of identical LDLR genetic defects. We aimed to elucidate why HoFH patients variably respond to PCSK9 inhibition.

**Approach and Results**—Lymphocytes were isolated from 22 HoFH patients enrolled in the TAUSSIG trial (Trial Assessing Long Term Use of PCSK9 Inhibition in Subjects With Genetic LDL Disorders). Ten patients were true homozygotes (FH1/FH1) and 5 identical compound heterozygotes (FH1/FH2). Lymphocytes were plated with or without mevastatin, recombinant PCSK9 (rPCSK9), or a PCSK9-neutralizing antibody. Cell surface LDLR expression was analyzed by flow cytometry. All HoFH lymphocytes had reduced cell surface LDLR expression compared with non-FH lymphocytes, for each treatment modality. Lymphocytes from FH1/FH2 patients (LDLR defective/negative) displayed the lowest LDLR expression levels followed by lymphocytes from FH1/FH1 patients (defective/defective). Mevastatin increased, whereas rPCSK9 reduced LDLR expression. The PCSK9-neutralizing antibody restored LDLR expression. Lymphocytes displaying higher LDLR expression levels were those isolated from patients presenting with lowest levels of LDL-C and apolipoprotein B, before and after 24 weeks of evolocumab treatment. These negative correlations remained significant in FH1/FH1 patients and appeared more pronounced when patients with apolipoprotein E3/E3 genotypes were analyzed separately. Significant positive correlations were found between the levels of LDLR expression and the percentage reduction in LDL-C on evolocumab treatment.

**Conclusions**—Residual LDLR expression in HoFH is a major determinant of LDL-C levels and seems to drive their individual response to evolocumab.

**Visual Overview**—An online [visual overview](#) is available for this article. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:592-598. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310217.)

**Key Words:** heterozygote ■ homozygote ■ lipids ■ metabolism ■ mutation

**H**omozygous familial hypercholesterolemia (HoFH) is a severe inherited disorder of lipoprotein metabolism resulting mostly from the presence of mutations on both alleles of the *LDLR* (low-density lipoprotein receptor) or in rare instances biallelic mutations of *APOB* (apolipoprotein B), *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin kexin type 9), or the *LDLRAP1* (LDLR adaptor protein).<sup>1-3</sup> These genetic defects sharply reduce the hepatic clearance of low-density lipoproteins (LDL). HoFH patients typically present with LDL cholesterol (LDL-C) plasma concentrations >500 mg/dL (13 mmol/L; although there can be considerable phenotypic

variability), leading to premature and often fatal cardiovascular events in the first decades of life.<sup>1,4</sup>

### See accompanying editorial on page 481

Conventional lipid-lowering treatments (LLT) currently available, statins and ezetimibe, are moderately effective in HoFH patients because they reduce LDL-C levels by only ≈25%. However, even this modest LDL-C reduction has been shown to delay cardiovascular events and prolong life.<sup>4,5</sup> These therapies are insufficient to bring HoFH patients to therapeutic target (ie, LDL-C <70 mg/dL [1.8 mmol/L]). Drugs that,

Received on: September 6, 2017; final version accepted on: December 14, 2017.

From the CRNH Ouest, INRA UMR 1280 PhAN (A.T., V.B., M.C., G.L.) and L'institut du thorax, INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291 (A.T., M.P., B.C.), Université de Nantes, France; L'institut du thorax, CHU de Nantes, CIC Endocrinologie-Nutrition, France (A.T., M.P., B.C.); Lipidology Division of Internal Medicine, University of Cape Town, South Africa (D.J.B.); INSERM UMR 1188 DéTROI, Université de La Réunion, Sainte Clotilde, France (S.R.-M., V.B., K.C., B.N., S.B., G.L.); Amgen, Thousand Oaks, CA (L.T.); CHU Dijon Bourgogne, Point Médical, France (M.F.); and Faculty of Health Sciences, University of Witwatersrand, Johannesburg, South Africa (F.J.R.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.117.310217/-/DC1>. Correspondence to Gilles Lambert, Inserm UMR 1188 DéTROI, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France. E-mail [gilles.lambert@univ-reunion.fr](mailto:gilles.lambert@univ-reunion.fr)

© 2017 American Heart Association, Inc.

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

DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310217

## Stable Isotope Kinetic Study of ApoM (Apolipoprotein M)

Mikaël Croyal, Stéphanie Billon-Crossouard,\* Sophie Goulitquer,\* Audrey Aguesse, Luis León, Fanta Fall, Maud Chétiveaux, Thomas Moyon, Valentin Blanchard, Khadija Ouguerram, Gilles Lambert, Estelle Nobécourt, Michel Krempf

**Objective**—ApoM (apolipoprotein M) binds primarily to high-density lipoprotein before to be exchanged with apoB (apolipoprotein B)-containing lipoproteins. Low-density lipoprotein (LDL) receptor-mediated clearance of apoB-containing particles could influence plasma apoM kinetics and decrease its antiatherogenic properties. In humans, we aimed to describe the interaction of apoM kinetics with other components of lipid metabolism to better define its potential benefit on atherosclerosis.

**Approach and Results**—Fourteen male subjects received a primed infusion of  $^2\text{H}_3$ -leucine for 14 hours, and analyses were performed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry from the hourly plasma samples. Fractional catabolic rates and production rates within lipoproteins were calculated using compartmental models. ApoM was found not only in high-density lipoprotein (59%) and LDL (4%) but also in a non-lipoprotein-related compartment (37%). The apoM distribution was heterogeneous within LDL and non-lipoprotein-related compartments according to plasma triglycerides ( $r=0.86$ ;  $P<0.001$ ). The relationships between sphingosine-1-phosphate and apoM were confirmed in all compartments ( $r$  range, 0.55–0.89;  $P<0.05$ ). ApoM fractional catabolic rates and production rates were  $0.16\pm 0.07$  pool/d and  $0.14\pm 0.06$  mg/kg per day in high-density lipoprotein and  $0.56\pm 0.10$  pool/d and  $0.03\pm 0.01$  mg/kg per day in LDL, respectively. Fractional catabolic rates of LDL-apoM and LDL-apoB100 were correlated ( $r=0.55$ ;  $P=0.042$ ). Significant correlations were found between triglycerides and production rates of LDL-apoM ( $r=0.73$ ;  $P<0.004$ ).

**Conclusions**—In humans, LDL kinetics play a key role in apoM turnover. Plasma triglycerides act on both apoM and sphingosine-1-phosphate distributions between lipoproteins. These results confirmed that apoM could be bound to high-density lipoprotein after secretion and then quickly exchanged with a non-lipoprotein-related compartment and to LDL to be slowly catabolized.

**Visual Overview**—An online [visual overview](#) is available for this article. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:255-261. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310208.)

**Key Words:** apolipoproteins ■ lipid metabolism ■ lipoproteins ■ sphingosine-1-phosphate ■ triglycerides

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

Kinetic studies with stable isotope tracers have provided important knowledge in lipoprotein metabolism,<sup>13</sup> recently improved by new advances in mass spectrometry.<sup>14-16</sup> These new approaches, based on an enzymatic proteolysis and targeted analysis of specific peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, allowed the measurements of apolipoproteins not previously studied.<sup>14</sup> Reports have already shown that plasma apoM concentrations were negatively associated with catabolic rates of HDL<sup>17</sup> and LDL,<sup>18</sup> but to our knowledge, no study focused on the whole-body apoM kinetics except 1 study from Singh et al<sup>16</sup> who analyzed the kinetics of several apolipoproteins but only in different HDL subfractions. Here, we aimed to perform a specific kinetic study of the apoM to give further insights on its metabolism and the relationship with a wide range of lipoprotein components to identify the potential links with cardiovascular prevention.

Received on: September 1, 2017; final version accepted on: October 30, 2017.

From the INRA, UMR 1280, CHU Hôtel-Dieu, Faculty of Medicine, University of Nantes, France (M.C., S.B.-C., A.A., L.L., F.F., T.M., K.O., E.N., M.K.); CRNHO, West Human Nutrition Research Center, Nantes, France (M.C., S.B.-C., A.A., F.F., M.C., V.B., K.O., E.N., M.K.); INSERM-UBO, UMR 1078-ECLA, IBSAM, School of Medicine, University of Brest, France (S.G.); Biotechnology Program, National School of Medicine and Homeopathy, National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico (L.L.); INSERM UMR 1188 DÉTROIT, University of La Réunion, Sainte-Clotilde, France (G.L.); CHU de la Réunion, School of Medicine, University of la Réunion, Saint-Denis, France (E.N.); and Department of Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition, G and R Laennec Hospital, Nantes, France (M.K.).

\*These authors contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.117.310208/-/DC1>. Correspondence to Michel Krempf, MD, PhD, Department of Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition, G and R Laennec Hospital, IRS-UN - 8, quai Moncoussu - 44000 Nantes, France. E-mail [michel.krempf@univ-nantes.fr](mailto:michel.krempf@univ-nantes.fr)

© 2017 American Heart Association, Inc.

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

DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310208



## **Approches biochimique, épidémiologique et clinique du métabolisme intégré de la Lipoprotéine (a)**

Une personne sur cinq dans la population générale présente des niveaux plasmatiques élevés en lipoprotéine (a) [Lp(a)], une lipoprotéine extrêmement athérogène qui ressemble aux LDL. Les études physiopathologiques, épidémiologiques, et génétiques démontrent que lorsque la concentration sanguine en Lp(a) dépasse 125 nmol/L, la survenue d'événements cardiovasculaires augmente très fortement.

La différence structurale majeure entre Lp(a) et LDL est que la Lp(a) contient une protéine caractéristique supplémentaire, l'apo(a), de taille très variable car elle contient entre 1 et 40 répétitions du domaine Kringle IV<sub>2</sub> (KIV<sub>2</sub>). La taille de l'apo(a) est inversement corrélée aux concentrations plasmatiques en Lp(a). Outre l'apo(a), l'apoE et PCSK9 sont les deux seules autres protéines circulantes connues pour moduler les taux de Lp(a). L'objet de mes travaux de thèse a été de déterminer comment la taille de l'apo(a), le polymorphisme de l'apoE et l'inhibition pharmacologique de PCSK9 régulent les niveaux de Lp(a).

Nous avons d'abord développé une approche méthodologique originale de spectrométrie de masse pour doser les apolipoprotéines, déterminer leurs polymorphismes, et en évaluer les flux métaboliques. Nous avons également mis au point une technique de séparation résolutive des différentes isoformes de l'apo(a) sur gel d'agarose.

Nous montrons par spectrométrie de masse que l'apoE présente sur les VLDL gouverne la production (synthèse/assemblage) de la Lp(a). Par ailleurs, nous avons établi que les patients hypercholestérolémiques familiaux porteurs de l'isoforme E2 de l'apoE présentent des concentrations de Lp(a) plus faibles comparativement aux porteurs des isoformes E3 et E4, ce qui leur confère un taux de récurrence pour les événements vasculaires réduit.

Enfin, nous avons démontré chez des patients à haut risque cardiovasculaire que la réponse à un traitement par inhibiteurs de PCSK9 en termes de réduction de la Lp(a), est proportionnelle à la taille de l'apo(a). Nous avons également observé que le traitement par aphaérese d'un patient présentant des niveaux très élevés en Lp(a), le protège contre une récurrence d'infarctus du myocarde.

L'ensemble de mes résultats nous a permis de déterminer les modalités physiologiques par lesquelles la taille de l'apo(a) et le polymorphisme de l'apoE modulent les niveaux circulants de cette lipoprotéine extrêmement athérogène. Les thérapies actuelles (inhibiteurs de PCSK9, aphaérese) restent cependant insuffisantes pour une prise en charge optimale des patients avec une Lp(a) élevée.

**Mots clés :** Lipoprotéine (a), apo(a), apoE, polymorphisme, PCSK9, spectrométrie de masse.

## **Biochemical, Epidemiological and Clinical Investigation of Lipoprotein (a) Metabolism**

One in five individuals in the population displays elevated circulating levels of lipoprotein (a) [Lp(a)], a highly atherogenic lipoprotein resembling LDL. Pathophysiological, epidemiological and genetic studies demonstrate that circulating Lp(a) levels above 125 nmol/L are associated with a sharp increase in cardiovascular events rate.

The major structural difference between Lp(a) and LDL is that Lp(a) contains a signature protein, apo(a), extremely polymorphic in size as it contains 1 to more than 40 Kringle IV<sub>2</sub> (KIV<sub>2</sub>) domains. The size of apo(a) is inversely correlated with the circulating levels of Lp(a). Besides apo(a), apoE and PCSK9 are the only other plasma proteins known to modulate Lp(a) levels. The aims of my PhD project were to assess how the size of apo(a), the polymorphism of apoE and the pharmacological inhibition of PCSK9 govern Lp(a) plasma concentrations.

First, we have developed a robust methodological approach to quantitatively assay apolipoproteins, assess their polymorphisms and evaluate their metabolic fluxes by mass spectrometry. In addition, we have set up a resolutive separation technique allowing the investigation of distinct apo(a) isoforms on agarose gels.

We then showed using mass spectrometry that apoE specifically present on VLDL impacts on Lp(a) production, synthesis and/or assembly. In addition, we clearly established that familial hypercholesterolemic patients specifically carrying the apoE2 isoform display reduced Lp(a) plasma levels and are thereby less prone to recurrent cardiovascular events compared with apoE3 or E4 carriers.

Finally, we demonstrate that the response to PCSK9 inhibitor treatments of patients at high cardiovascular risk in terms of Lp(a) lowering is proportional to the size of apo(a). We also observed that apheresis procedures performed on a patient with extreme Lp(a) plasma levels reduce his risk of undergoing recurrent myocardial infarction.

Taken together, my PhD results allowed us to decipher the physiological modalities by which apo(a) size and apoE polymorphism modulate the circulating levels of this extremely atherogenic lipoprotein species. The therapies currently available (PCSK9 inhibitors, plasmapheresis) remain however clearly insufficient to treat patients with elevated Lp(a).

**Key words:** Lipoprotein (a), apo(a), apoE, polymorphism, PCSK9, mass spectrometry.