



**HAL**  
open science

# Les Arginines méthylées et triméthylamines plasmatiques : de nouveaux marqueurs d'incidences cardiovasculaires chez les patients à risque élevé

Audrey Aguesse

► **To cite this version:**

Audrey Aguesse. Les Arginines méthylées et triméthylamines plasmatiques : de nouveaux marqueurs d'incidences cardiovasculaires chez les patients à risque élevé. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-02423146

**HAL Id: hal-02423146**

**<https://ephe.hal.science/hal-02423146>**

Submitted on 10 Mar 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.



École Pratique  
des Hautes Études



**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MÉMOIRE**

**Présenté**

**Par**

**AGUESSE AUDREY**

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études.

**Arginines méthylées et triméthylamines plasmatiques : de nouveaux  
marqueurs d'incidences cardiovasculaires chez les patients à risque élevé.**

**Soutenu le 17/12/2019**

Dr LAGROYE Isabelle

Pr KREMPF Michel

Dr CROYAL Mikael

Dr DEMIGNOT Sylvie

Dr BICHON Emmanuelle

Dr GUYOT Sylvain

**Devant le jury suivant :**

– Président

– Tuteur scientifique

– Tuteur scientifique

– Tuteur pédagogique

– Rapporteur (Chimiste analytique spectrométrie de masse - Nantes)

– Examineur (Chimiste analytique spectrométrie de masse - Rennes)

**Mémoire préparé sous la direction de :**

Pr KREMPF Michel et Dr DEMIGNOT Sylvie

**Intitulé de la structure d'accueil :** Plateforme CRNHO de spectrométrie de masse, Nantes

**Directeur :** Dr LALLES Jean-Paul, directeur du CRNH-O

**Intitulé de la structure d'accueil EPHE :** UMR\_S 938 Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), PARIS

**Directeur :** Pr FEVE Bruno

**EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)**

**Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE :** Les Cellules et leur environnement :  
Dynamique des Interactions (CEDI)



## REMERCIEMENTS

Je remercie les membres de mon jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de diplôme de l'EPHE. Merci à **Isabelle LAGROYE** d'avoir accepté de présider le jury ; à **Emmanuelle BICHON** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de diplôme de l'EPHE en qualité de rapporteur, et également merci à **Sylvain GUYOT** d'avoir accepté d'être mon examinateur.

**Michel KREMPF**, je vous remercie de m'avoir suivi, soutenu dans ma démarche d'évolution de carrière et de m'avoir fait confiance toutes ces années à travailler à vos côtés et à perfectionner mon expérience en spectrométrie de masse au sein de votre laboratoire. Merci pour vos différents conseils tant scientifiques que sur ma carrière professionnelle, merci pour votre sympathie et gentillesse tout au long de ces 10 ans à travailler ensemble.

**Mikael CROYAL**, je te remercie pour ton investissement dans mon travail du diplôme de l'EPHE, sans toi j'aurais eu du mal à arriver au bout de mon projet et mon travail n'aurait pas été d'aussi bonne qualité. Malgré ton emploi du temps bien chargé, tu as réussi à trouver du temps pour me corriger et m'aider dans mes réflexions tout au long de ce travail. En plus du travail que nous avons effectué ensemble pour le diplôme de l'EPHE, cela fait maintenant plus de 5 ans que nous travaillons ensemble, grâce à toi j'ai perfectionné mon savoir-faire en spectrométrie de masse. Tu as su me faire confiance pour le développement des dosages au sein de la plateforme de spectrométrie de masse, mais aussi tu as su mettre à l'épreuve mes capacités de technicienne et de futur ingénieur. C'est grâce à tout ce travail, les challenges scientifiques que tu me demandais de réaliser que j'ai eu envie de passer ce diplôme de l'EPHE et qui m'ont donné encore plus envie de continuer dans cette voie, la recherche médicale en qualité d'ingénieur ... si je trouve les bonnes opportunités.

**Sylvie DEMIGNOT**, je vous remercie d'avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique, d'avoir corrigé et évalué mon travail tout au long de ces 2 ans. Vous avez su m'accompagner, me conseiller pour mes rapports et le choix de mes cours. Nos échanges par mails et/ou téléphones m'ont permis de me sentir également soutenu de la part du diplôme. Je vous remercie pour votre gentillesse et vos disponibilités pour nos divers échanges scientifiques. Merci pour la journée de diplôme de l'EPHE qui m'a été bénéfique pour mon projet de recherche, mon entraînement à l'orale afin de prendre plus confiance en moi.

**Aux chercheurs et enseignants EPHE**, je vous remercie pour vos cours et vos conseils scientifiques qui ont attiré ma curiosité scientifique vers d'autres domaines que la spectrométrie de masse.

**Stéphanie Crossouard**, je te remercie pour le travail d'équipe que nous réalisons ensemble, nos bons moments passés au laboratoire, et nos échanges scientifiques.

**Les amis de l'institut du thorax**, Damien Garçon, Manon Durand, Aurélie Thédrez et toute l'équipe IV, je vous remercie pour nos échanges tant scientifiques que « déconnades », pour vos visites surprises à la plateforme et vos petites blagues ... la plateforme double rapidement d'effectif avec vous ! Merci !

**Merci aux anciens étudiants** de la plateforme de spectrométrie de masse, master 1 / master 2, pour certains vous avez même terminé votre thèse ou êtes en fin de thèse, Dr Fanta Fall ou futur Dr Valentin Blanchard, futur Dr Stéphane Ramin-Mangata, Chloé Cloteau et tous ceux que je ne cite pas, mais que je n'oublie pas, car en 10 ans de travail à la plateforme il y en a eu des étudiants avec qui j'ai travaillé, que j'ai formés pour certains et avec lesquels j'ai même eu des cours de cuisines... Je vous remercie tous pour ces bons moments passés ensemble, nos échanges scientifiques qui m'ont permis d'acquérir mon expérience de formatrice et m'ont donné l'envie et la force d'aller au bout de ce projet de recherche et de ce diplôme.

**Merci à Zied Kaabia** qui a su me convaincre de réaliser le diplôme de l'EPHE, tu as su me montrer que j'avais les compétences pour y arriver grâce à nos échanges scientifiques très constrictifs. Tu avais toujours la question pour me faire réfléchir à pourquoi je faisais de telle manière tel dosage ou tel développement ... Et merci pour nos moments de fous rires et de partage culturel.

**Merci à Catherine Michel**, qui a su reconnaître en moi une bonne technicienne et qui m'a donné la chance de travailler à ses côtés pour ma première expérience dans la recherche médicale. Tu m'as appris à être exigeante envers moi-même et à toujours avoir un esprit critique sur mes résultats. Sans oublier le plus important, tu m'as donné envie de persévérer dans le domaine de la recherche médicale et de continuer à cultiver ma curiosité scientifique, apprendre et évoluer.

**Mes amis**, Julien, Olivia, Carole, Thomas, Elsa, François et « la team » UMR-PHAN, je vous remercie d'être présent pour moi, de me soutenir dans mes décisions pour certaines folles et de me changer les idées quand j'en ai besoin. Merci les « potos » !

**Les étudiants EPHE**, Jérôme, Sandy, Angéline, je vous remercie pour votre soutien et votre motivation pour la formation. L'entraide qu'il y avait lors des cours, « la team EPHE », les cours n'étaient pas faciles, car il ne s'agissait pas de mon domaine. Grâce à vous j'ai su réussir et me faire confiance dans mon apprentissage et vous m'avez donné envie de voir plus loin...

**Les parisiens**, que j'ai retrouvé grâce aux cours que j'ai suivis sur Paris, je vous remercie d'avoir été là, car grâce à vous j'ai supporté ces semaines dures d'apprentissage à décompresser autour d'une bière dans les bars insolites de Paris !

**Ma famille**, je ne vous remercierais jamais assez d'être là pour moi, de me soutenir dans mes choix et de m'avoir motivé à aller au bout de ma formation. Si j'en suis arrivée là aujourd'hui, c'est grâce à vous ! Un « IMMENSE » merci pour tout ce que vous faites pour moi, d'être là dans les bons comme dans les mauvais moments... de croire en moi, en mes capacités, en mes choix. Merci de m'avoir donné la volonté, le courage et le caractère pour m'en sortir. Et je pense que vous n'en avez pas fini avec moi et mes choix toujours plus fous les uns des autres ... Vous êtes ce qu'il y a de plus précieux pour moi !

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Liste des communications</b> .....	<b>3</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>7</b>
<b>I. Introduction générale</b> .....	<b>9</b>
<b>II. État de l'art</b> .....	<b>12</b>
II.1 Les facteurs de risque cardiovasculaire .....	12
II.1.1 Les maladies cardiovasculaires .....	12
II.1.2 Le diabète de type 2 et l'insuffisance rénale chronique .....	13
II.1.3 L'obésité et les dyslipidémies mixtes.....	15
II.2 Les nouveaux marqueurs de risque cardiovasculaire au-delà des lipides .....	17
II.2.1 Le N-oxyde de triméthylamine (TMAO) .....	17
II.2.2 Les arginines méthylées.....	21
II.3 Les méthodes d'analyses .....	23
II.3.1 La chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC).....	23
II.3.2 La spectrométrie de masse.....	30
<b>III. Objectif de l'étude</b> .....	<b>37</b>
<b>IV. Matériel et méthodes</b> .....	<b>38</b>
IV.1 Les patients .....	38
IV.1.1 Patients atteints de maladies rénales chroniques (CKD) .....	38
IV.1.2 Patients atteints d'obésité morbide.....	39
IV.1.3 Patients diabétiques (SURDIAGENE) .....	40
IV.2 Préparation des échantillons .....	42
IV.2.1 TMAO et métabolites associés.....	42

IV.2.2 L'ADMA et ses métabolites associés.....	45
IV.2.3 Analyses des données .....	48
<b>V. Résultats.....</b>	<b>51</b>
V.1 Développements méthodologiques .....	51
V.1.1 TMAO et métabolites associés.....	52
V.1.2 ADMA et métabolites associés .....	55
V.1.3 Stabilité et effet matrice.....	58
V.2 Modulation des marqueurs en cas d'insuffisance rénale.....	59
V.2.1 TMAO et méthylamines .....	60
V.2.2 ADMA et arginines méthylées.....	63
V.2.3 Conclusion des analyses dans le cas des insuffisantes rénaux.....	66
V.3 Modulation des marqueurs dans l'obésité .....	66
V.3.1 TMAO et méthylamines .....	67
V.3.2 ADMA et arginines méthylées.....	70
V.3.3 Conclusion des analyses dans les cas de l'obésité .....	73
V.4 Rôle pronostique des marqueurs dans le risque cardiovasculaire des patients diabétiques. ....	73
V.4.1 Le TMAO.....	74
V.4.2 L'ADMA .....	75
V.4.3 Corrélations multiparamétriques.....	77
V.4.4 Conclusion et perspectives sur le rôle pronostique du TMAO et de l'ADMA dans le risque cardiovasculaire des patients diabétiques.....	78
<b>VI. Discussion et perspectives .....</b>	<b>79</b>
<b>VII. Références bibliographiques .....</b>	<b>87</b>



## LISTE DES COMMUNICATIONS

Croyal M, Gand E, Saulnier PJ, **Aguesse A**, Cariou B, Krempf M, Hadjadj S. Oxyde de triméthylamine (TMAO), Bétaïne, Choline et Carnitine et événements cardiovasculaires chez les sujets diabétiques de type 2 : Analyse de la cohorte SURDIAGENE. *Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA)*. Biarritz, France, 20 juin 2018.

Croyal M, Gand E, Saulnier PJ, **Aguesse A**, Cariou B, Krempf M, Hadjadj S. *Plasma concentrations of betaine, choline, carnitine and TMAO and progression to end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes: the SURDIAGENE cohort*. *European Diabetic Nephropathy Study Group Congress (EDNSG)*. Groningue, Pays-Bas, 19 mai 2018.

Croyal M, Gand E, Saulnier PJ, **Aguesse A**, Cariou B, Krempf M, Hadjadj S. Oxyde de triméthylamine (TMAO), Bétaïne, Choline et Carnitine et événements cardiovasculaires chez les sujets diabétiques de type 2 : Analyse de la cohorte SURDIAGENE. *Société Francophone du Diabète (SFD)*. Nantes, France, 23 mars 2018.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Classification, prévalence et plan d'action pour les stades de l'insuffisance rénale chronique. ....	14
<b>Tableau 2 :</b> Caractéristiques cliniques des 99 patients CKD et des 18 patients contrôles .....	38
<b>Tableau 3 :</b> Caractéristiques cliniques des 31 patients atteints d'obésité morbide.....	39
<b>Tableau 4 :</b> Paramètres biologiques, morphométriques initiales et incidence cumulée des évènements cardiovasculaires de la cohorte SURDIAGENE .....	41
<b>Tableau 5 :</b> Paramètres SRM utilisés pour l'analyse du TMAO et des métabolites associés .....	45
<b>Tableau 6 :</b> Paramètres SRM utilisés pour l'analyse de l'ADMA et des métabolites associés ...	47
<b>Tableau 7 :</b> Les différents tests statistiques réalisés durant le projet de recherche .....	48
<b>Tableau 8 :</b> Tableau de corrélation de Spearman du TMAO et ses métabolites associés plasmatiques chez les insuffisants rénaux. ....	62
<b>Tableau 9 :</b> Corrélations de Spearman de l'ADMA et ses métabolites associés chez les insuffisants rénaux .....	65
<b>Tableau 10 :</b> Corrélation de Spearman entre le TMAO et ses métabolites associés et les paramètres cliniques des patients obèses.....	69
<b>Tableau 11 :</b> Corrélations de Spearman entre l'ADMA et ses métabolites associés et les paramètres cliniques des patients obèses ayant subi une chirurgie bariatrique.....	71
<b>Tableau 12 :</b> Modulations des différents métabolites en fonction des MACE.....	74
<b>Tableau 13 :</b> Corrélations des métabolites marqueur des risques de MCV et de l'insuffisance rénale .....	78

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Représentation des techniques de chirurgie bariatrique appliquée dans ce projet de recherche.....	17
<b>Figure 2 :</b> Métabolisme du TMAO .....	18
<b>Figure 3 :</b> Métabolisme simplifié de l'ADMA .....	22
<b>Figure 4 :</b> Représentation schématique de la phase stationnaire silice présentant ses groupements silanols (-OH). .....	26
<b>Figure 5 :</b> Triangle de Snyder .....	27
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique de la phase stationnaire inversée greffée C18 .....	28
<b>Figure 7 :</b> Représentation schématique d'un système de spectrométrie de masse.....	31
<b>Figure 8 :</b> Représentation schématique d'une source électrospray en mode positif.....	33
<b>Figure 9 :</b> Principe du quadripôle.....	34
<b>Figure 10 :</b> Principe de la spectrométrie de masse en tandem avec un système triple quadripôle. ....	35
<b>Figure 11 :</b> Représentation schématique d'une sélection en mode SRM.....	36
<b>Figure 12 :</b> Réaction de dérivation de la TMA.....	43
<b>Figure 13 :</b> Représentation schématique du gradient chromatographique utilisé pour l'analyse du TMAO et des métabolites associés sur colonne HILIC .....	44
<b>Figure 14 :</b> Réaction de dérivation des arginines méthylées .....	45
<b>Figure 15 :</b> Représentation schématique du gradient chromatographique utilisé pour l'analyse de l'ADMA et des métabolites associés sur colonne BEH-C18. ....	47
<b>Figure 16 :</b> Spectres de masse acquis en mode SCAN (A) et en mode SCAN d'ions produits (B) du TMAO et méthylamines .....	52
<b>Figure 17 :</b> Profils chromatographiques de chaque standard analytique à partir d'une solution mixte injectée sur le système UHPLC.....	53
<b>Figure 18 :</b> Linéarité du dosage du TMAO et de ses métabolites.....	54
<b>Figure 19 :</b> Répétabilité et reproductibilité du dosage des méthylamines.....	55

<b>Figure 20 :</b> Chromatogrammes acquis en mode « <i>daughter</i> » Scan (A) et spectres MS/MS des ions produits des arginines méthylées dérivées (B). .....	56
<b>Figure 21 :</b> Linéarité du dosage de l'ADMA et de ses métabolites. ....	57
<b>Figure 22 :</b> Répétabilité et reproductibilité du dosage des méthylamines.....	58
<b>Figure 23 :</b> Corrélations de Spearman obtenues entre le mGFR et les paramètres lipidiques. ....	59
<b>Figure 24 :</b> TMAO plasmatique et corrélation de Spearman avec le taux de filtration glomérulaire mesurés chez les insuffisants rénaux. ....	60
<b>Figure 25 :</b> Concentrations plasmatiques des métabolites associés au TMAO en fonction de l'insuffisance rénale .....	61
<b>Figure 26 :</b> Quantification de l'ADMA plasmatique et corrélation de Spearman avec le mGFR chez les insuffisants rénaux .....	63
<b>Figure 27 :</b> Métabolites associés à l'ADMA et leurs corrélations avec le mGFR chez les insuffisants rénaux .....	64
<b>Figure 28 :</b> Evaluation de l'IMC après chirurgie bariatrique. ....	67
<b>Figure 29 :</b> Dosages du TMAO et ses métabolites associés chez les patients obèses avant/après chirurgie bariatrique. ....	68
<b>Figure 30 :</b> Quantification de l'ADMA sérique et corrélation de Spearman avec l'indice de masse corporelle des patients obèses.....	70
<b>Figure 31 :</b> Quantification des métabolites associés à l'ADMA et corrélation de Spearman avec l'indice de masse corporelle chez les patients obèses. ....	72
<b>Figure 32 :</b> Modulations du TMAO en fonction de l'obésité et de l'insuffisance rénale .....	75
<b>Figure 33 :</b> Modulations de l'ADMA en fonction de l'obésité et de l'insuffisance rénale.....	76
<b>Figure 34 :</b> Estimation de l'indice de méthylation de l'arginine chez les patients DT2 ayant présenté ou non des MACEs.....	77

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADMA :</b>	Diméthylarginine asymétrique
<b>ALAT :</b>	Alanine aminotransférase
<b>ArgMI :</b>	Méthylation de l'arginine
<b>ASAT :</b>	Aspartate aminotransférase
<b>ATP :</b>	Adénosine triphosphate
<b>AVC :</b>	Accident vasculaire cérébrale
<b>BEH :</b>	<i>Ethylene Bridged Hybrid</i>
<b>CI :</b>	<i>Chemical ionization</i> , ionisation chimique
<b>CKD :</b>	<i>Chronic kidney disease</i> , maladie rénale chronique
<b>CT :</b>	Cholestérol total
<b>CV :</b>	Cardiovasculaire
<b>DDAH :</b>	Diméthylarginine diméthyl-aminohydrolase
<b>DT2 :</b>	Diabète de type 2
<b>EI :</b>	Impact électronique
<b>ESI :</b>	Source électrospray
<b>FMO :</b>	Flavines mono-oxygénases
<b>GFR :</b>	<i>Glomerular filtration rate</i> , Taux de filtration glomérulaire
<b>HbA1c :</b>	Hémoglobine glyquée
<b>H-Class :</b>	Chromatographie liquide de haute performance, Waters Corporation
<b>HDL :</b>	<i>High density lipoprotein</i> , lipoprotéine de haute densité
<b>HDL-C :</b>	Cholestérol des lipoprotéines de haute densité
<b>HILIC :</b>	Chromatographie liquide d'interaction hydrophile
<b>HOMA-IR :</b>	<i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i> , Indice de résistance à l'insuline
<b>IMC :</b>	Indice de masse corporelle
<b>LC-MS :</b>	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
<b>LC-MS/MS :</b>	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
<b>LDL :</b>	<i>Low density lipoprotein</i> , lipoprotéine de basse densité
<b>LDL-C :</b>	Cholestérol des lipoprotéines de basse densité
<b>MACE :</b>	<i>Major adverse cardiovascular events</i> , événements cardiovasculaires indésirables majeurs
<b>MCV :</b>	Maladies cardiovasculaires
<b>SRM :</b>	<i>Single reaction monitoring</i>

<b>NMMA :</b>	N-mono-méthylarginine
<b>NO :</b>	Monoxyde d'azote
<b>NPLC :</b>	<i>Normal-phase liquid chromatography</i> , la chromatographie liquide en phase normale
<b>PRMT :</b>	Protéine méthyltransférase
<b>RE :</b>	Réticulum endoplasmique
<b>RPLC :</b>	<i>Reversed-phase liquid chromatography</i> , La chromatographie liquide en phase inverse
<b>RYGB :</b>	Roux-en-Y Gastric Bypass, technique de chirurgie bariatrique
<b>SD :</b>	<i>Standard deviation, écartype</i>
<b>SDMA :</b>	Diméthylarginine symétrique
<b>SEM :</b>	Ecartype moyen
<b>SI :</b>	Standard interne
<b>TG :</b>	Triglycérides
<b>TMA :</b>	Triméthylamine
<b>TMAO :</b>	Oxyde de triméthylamine
<b>TQD :</b>	Triple quadripôle
<b>UHPLC :</b>	Chromatographie liquide à ultra haute performance
<b>UPLC :</b>	Chromatographie liquide ultra-performante marque déposé par WATERS corporation (™).

## I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

**Les maladies cardiovasculaires (MCVs)** restent la première cause de mortalité dans les pays occidentaux<sup>1</sup>. Les initiatives de prévention, les développements pharmaceutiques ainsi que les améliorations technologiques ont conduit à un succès important dans la réduction de la mortalité liée aux MCVs dans certains pays du monde occidental<sup>2</sup>. Néanmoins, la MCV athéroscléreuse reste la principale cause de décès prématuré en Europe<sup>2</sup>. Par ailleurs, plus de 80% de la mortalité liée aux MCVs survient dans les pays en développement<sup>3</sup>. La mortalité, mais également l'invalidité causée par les MCVs, restent extrêmement élevées et sont donc les principales causes somatiques de perte de productivité. Les années de vie corrigées par l'invalidité (*disability-adjusted life years, DALYs*) devraient passer de 85 millions DALYs en 1990 à environ 150 millions DALYs en 2020<sup>3</sup>. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a souligné l'importance des modes de vies, tels que le tabagisme, les mauvaises habitudes alimentaires, l'inactivité physique et le stress psychologique dans le développement des MCVs dans le monde occidental<sup>4</sup>. Malgré les récents progrès thérapeutiques, une part non négligeable des patients a pour première manifestation une mort subite pour laquelle aucune prise en charge préventive n'a pu être mise en place<sup>4</sup>. L'identification des individus à haut risque cardiovasculaire permettrait donc d'instaurer des mesures préventives dont le but serait de réduire la mortalité et la morbidité cardiovasculaires.

**Les facteurs de risque cardiovasculaire** représentent souvent plusieurs conditions participant à la formation des lésions d'athérome ou favorisant leur instabilité. Un lien causal avec le développement de la maladie est présent. Les marqueurs de risque cardiovasculaire n'ont pas ce rôle étiologique mais ils indiquent, par leur présence et leur degré, l'étendue ou le risque de l'atteinte cardiovasculaire. Pris seul, un facteur de risque ne permet pas d'identifier de manière satisfaisante les patients les plus à risque. Par contre, l'association de plusieurs facteurs de risque permet d'améliorer l'estimation de celui-ci. Parmi les marqueurs de risque traditionnels, ceux liés aux altérations du métabolisme des lipides et des lipoprotéines sont particulièrement utilisés. En effet, ces derniers conduisent aux dyslipidémies mixtes athérogènes et augmentent le risque de complications en favorisant le développement de l'athérosclérose<sup>5</sup>. Ces états physiopathologiques sont caractérisés par des niveaux élevés de triglycérides et de cholestérol, notamment celui porté par la voie athérogène des lipoprotéines de basse densité (LDL). Le cholestérol porté par les lipoprotéines protectrices de haute densité (HDL) est, quant à lui, souvent diminué. A ces états délétères s'ajoutent souvent le développement d'un diabète de type 2 (DT2) accroissant de façon

importante le risque de complications cardiovasculaire<sup>6</sup>. La stéatose hépatique non alcoolique est une pathologie fréquente, dont la prévalence tend à augmenter parallèlement à l'accroissement de la population obèse, dyslipidémique ou diabétique<sup>7</sup>. Cependant l'interaction entre la stéatose hépatique, le diabète et les MCVs reste mal comprise<sup>8</sup>, et des marqueurs circulants pronostiques et précoces de ces pathologies pourraient aider à la mise en évidence des populations à considérer en priorité<sup>9,10</sup>. La caractérisation de ces nouveaux marqueurs nécessite également la compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans leur modulation (anabolisme, catabolisme).

**L'insuffisance rénale chronique (IRC)** est un facteur de risques cardiovasculaires. Les risques cardiovasculaires sont très élevés chez les patients avec une insuffisance rénale chronique par rapport à la population générale. Toute modification des conditions circulatoires, quelle qu'en soit la cause (modification de résistances artérielles systémiques ou locales, défaillance cardiaque, anémie), induit des altérations touchant à la fois la filtration glomérulaire, l'homéostasie et les différents processus d'élimination des déchets de l'organisme<sup>11</sup>. Les facteurs contribuant aux maladies cardiovasculaires débutent dès les stades précoces de l'IRC et conduisent à la dilatation et l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'altération du remodelage cardiaque, la fibrose myocardique, l'insuffisance cardiaque et les maladies vasculaires périphériques (athérosclérose et artériosclérose).

**L'obésité** est également un problème majeur de santé publique dont la prévalence est en constante évolution. Celle-ci est fréquemment associée à des complications métaboliques comme le DT2, l'hypertension et diverses dyslipidémies, entraînant une réduction de la qualité et de l'espérance de vie. Actuellement, la chirurgie bariatrique est l'alternative thérapeutique la plus efficace chez les patients souffrant d'obésité morbide. Outre sa grande efficacité à réduire l'indice de masse corporelle (IMC), elle réduit également les complications métaboliques associées à la pathologie, y compris les dyslipidémies, la résistance à l'insuline (DT2) et le risque cardiovasculaire associé au surplus de masse graisseuse, notamment abdominale<sup>12</sup>. L'obésité est à la fois un facteur de risque indépendant de MCV, mais elle est également étroitement liée à plusieurs autres facteurs de risque<sup>13</sup>.

**Le diabète de type 2** augmente aussi le risque de MCV et de syndrome coronaire aigu de deux à quatre fois par rapport à la population générale<sup>14</sup>. Il est important de noter que l'obésité, l'inactivité physique et la mauvaise qualité de l'alimentation sont toutes liées au DT2 et aux MCVs<sup>15</sup>.



**La compréhension des fonctions physiologiques** peut se faire selon trois grands axes que sont la génomique, la protéomique et la métabolomique. La génomique met en avant les prédispositions qu'un patient peut avoir pour une pathologie dans une population donnée. La protéomique, quant à elle, implique l'analyse globale des protéines qui sont impliquées dans de multiples fonctions cellulaires. Enfin, la métabolomique consiste en l'étude de l'ensemble des métabolites endogènes, c'est-à-dire les petites molécules produites par l'organisme<sup>1</sup>. Certains métabolites peuvent être de bons biomarqueurs de dérèglements physiopathologiques. La métabolomique a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs pouvant prédire les MCVs<sup>9,16</sup> tels que l'arginine et ses métabolites méthylés comme les diméthylarginines symétriques (SDMA) et asymétriques (ADMA) ou encore les métabolites de la phosphatidylcholine alimentaire comme la choline, le N-oxyde de triméthylamine (TMAO), le triméthylamine (TMA) et la bétaine<sup>9,10</sup>.

**Ce projet** s'inscrit dans ce contexte et a pour but premier la mise en place d'outils analytiques pertinents permettant le dosage de ces nouveaux marqueurs de risques cardiovasculaires chez des patients à haut risque. Les métabolites associés à l'ADMA et au TMAO ont ensuite été étudiés chez des patients obèses ayant subi une chirurgie bariatrique et chez des patients atteints de dysfonctionnements rénaux afin de mieux décrypter les mécanismes métaboliques sous-jacents à leurs modulations. Ces résultats ont été complétés par l'étude d'une plus large cohorte de patients atteints d'un DT2 (SURDIAGENE, 1468 patients) suivis prospectivement sur 7 ans, afin d'évaluer le pouvoir prédictif de ces biomarqueurs dans la survenue des évènements cardiovasculaires.

## II. ÉTAT DE L'ART

### II.1 Les facteurs de risque cardiovasculaire

#### II.1.1 Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires (MCV), comme l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde ou les syndromes coronariens aigus représentent des facteurs de risque importants pour la santé et contribuent de manière importante aux décès et aux maladies chroniques et incapacités dans le monde<sup>17</sup>. En 2012, l'étude mondiale sur la charge de morbidité a identifié l'hypertension, les cardiopathies ischémiques, le tabagisme et les maladies cérébro-vasculaires comme les principales causes de mortalité prématurée<sup>18</sup>. Ces facteurs de risque et ces maladies sont tous liés à des complications cardiovasculaires et représentent plus de 50% des décès dans le monde et plus de 20% des années de vie perdues en raison d'un décès prématuré ou d'une invalidité grave<sup>18,19</sup>. La pollution de l'air serait aussi associée à un certain nombre de MCVs<sup>20</sup> tout comme l'exposition aux bruits de l'environnement tels que la circulation, qui est considérée comme un facteur déclencheur de maladies cérébrales, cardiovasculaires et métaboliques<sup>21</sup>. Enfin, le stress mental (y compris les origines psychosociales) représente un autre facteur de risque environnemental important qui contribue clairement au risque cardiovasculaire et probablement aussi à la mortalité, comme l'a signalé l'étude INTERHEART de 2004 en démontrant que le stress psychosocial est associé à un risque plus élevé d'infarctus du myocarde<sup>22,23</sup>.

Il est important de comprendre que les facteurs de risques, qu'ils soient standards (hypertension artérielle, hypercholestérolémie, diabète de type 2 (DT2), l'obésité et le tabagisme chronique) ou environnementaux, conduisent finalement à l'athérosclérose, caractérisée par la formation de plaque d'athérome, c'est-à-dire accumulation segmentaire de lipides, glucides complexes, sang (produits sanguins), tissus adipeux, dépôts calcaires et autres minéraux au niveau des artères de gros et moyens calibre (aorte et ses branches, artères coronaires). L'athérosclérose est la première cause de mortalité et d'invalidité dans les pays développés<sup>24</sup> et le premier facteur modifiable de cette maladie est le tabagisme.

La maladie coronarienne est fortement associée aux événements cardiovasculaires à long terme (MACE : *major adverse cardiovascular events*)<sup>25</sup>. La douleur thoracique est un symptôme majeur des cardiopathies ischémiques, telles que l'angine de poitrine et le spasme de l'artère coronaire. La sténose coronarienne obstructive, le spasme de l'artère coronaire et le pont

myocardique sont des causes de l'ischémie myocardique<sup>26-28</sup>. Les ponts myocardiques et les spasmes de l'artère coronaire sont également des causes majeures d'angine de poitrine.

Les tests de diagnostic mis en place afin d'évaluer le stade de ces maladies ou de les prévenir impliquent la réalisation de tests de stress, d'électrocardiographie ou encore de tomodensitométrie cardiaque et coronarienne comme l'angiographie<sup>29,30</sup>. Cependant la sténose coronarienne obstructive nécessite un traitement actif avec revascularisation mécanique et une intervention médicamenteuse, car on sait qu'elle est étroitement liée à de mauvais pronostics tels qu'un syndrome coronarien aigu ou un infarctus du myocarde<sup>25,26</sup>. Cependant, si aucune lésion coronaire significative n'est constatée sur l'angiographie en dépit d'une douleur à la poitrine, le pronostic et son association sont limités.

C'est pourquoi il est nécessaire de mettre en évidence et d'identifier de nouveaux marqueurs de risques liés à ces maladies cardiaques afin de prévenir et/ou de mieux diagnostiquer les MCVs.

### **II.1.2 Le diabète de type 2 et l'insuffisance rénale chronique**

Le diabète est la principale cause de maladie rénale terminale (« *end-stage renal disease* » ou ESRD) aux États-Unis et en Europe<sup>31</sup>. Des données récentes ont également confirmé que les patients atteints d'un DT2 présentent un risque de maladie rénale terminale presque deux fois plus important que les patients non diabétiques<sup>32</sup>.

La principale cause de décès chez les personnes atteintes d'un DT2 ou de néphropathie chronique est d'origine cardiovasculaire (CV)<sup>6</sup>. Plusieurs études ont rapporté que le DT2 jouait un rôle dans l'augmentation de l'hypertension<sup>33</sup>, et que l'augmentation des niveaux d'hémoglobine glyquée (HbA<sub>1c</sub>), caractéristique de la surexposition glycémique des patients DT2<sup>34</sup>, favorisait les MCVs. Malgré les traitements actuels, il existe un risque résiduel plus élevé de complications CVs chez les patients diabétiques et qui est très variable d'un patient à l'autre. Ceci explique l'intérêt des efforts de la recherche pour détecter des nouveaux marqueurs plus pertinents que ceux utilisés traditionnellement dans la stratification du risque (cholestérol total, HDL et LDL cholestérol, triglycérides).

Bien que 80% des patients DT2 soient touchés par un évènement CV<sup>35</sup>, seuls 20 à 40% d'entre eux développent une maladie rénale diabétique durant leur vie. L'impact de l'insuffisance rénale chronique sur la mortalité CV a été clairement établi par le passé<sup>36</sup>. En effet, elle a été fortement associée à un risque élevé d'infarctus du myocarde et à une mortalité CV

indépendamment des autres facteurs de risque courants. Par ailleurs, les directives les plus récentes de la « *National Kidney Foundation* » et du comité national mixte de la prévention, la détection, l'évaluation et le traitement de l'hypertension artérielle, ont recommandé de considérer les personnes atteintes d'insuffisance rénale comme un groupe à risque CV élevé<sup>37,38</sup>.

L'identification des patients à haut risque CV, parmi ceux combinant une maladie rénale chronique (« *chronic kidney disease* » CKD) et un diabète, nécessite l'utilisation de marqueurs cliniques puissants pour une meilleure prise en charge médicale. La dysfonction rénale, mesurée par le taux de filtration glomérulaire (GFR), est probablement celui qui est le plus utilisé aujourd'hui<sup>39</sup>. Le niveau de la fonction rénale, quel que soit le diagnostic, détermine le stade de la maladie rénale chronique selon la classification de K / DOQI (recommandation de niveau A)<sup>37</sup>. Les données de la troisième enquête nationale sur la santé et la nutrition (NHANES III) montrent la prévalence croissante des complications de l'insuffisance rénale chronique à des niveaux inférieurs de GFR<sup>40</sup>. Le **Tableau 1** présente la classification des stades de l'insuffisance rénale chronique et la prévalence de chaque stade, estimée à l'aide des données de l'enquête nationale sur la santé et la nutrition<sup>41</sup>.

**Tableau 1 : Classification, prévalence et plan d'action pour les stades de l'insuffisance rénale chronique<sup>37</sup>.** Prévalence de CKD avec une définition élargie incluant une albuminurie  $\geq 30$  mg/g, quel que soit le niveau de eGFR, # La prévalence estimée pour les stades de 1 à 4 provient de la NHANES de 1988-1994 à 2011-2012 incluant 177 millions de patients âgés de 20 ans et plus. \* La prévalence estimée du stade 5 provient du système de données rénales des Etats Unis de 1998, incluant environ 230 000 patients sous dialyse et 70 000 patients non dialysés<sup>41,42</sup>.

STADES DE CKD	DESCRIPTION	GFR (mL/min) par 1,73 m <sup>2</sup>	Prévalence, (%)
1	Lésions rénales avec un GFR augmenté ou normal	$\geq 90$	3,3#
2	Lésions rénales avec légère diminution du GFR	60 – 89	3,0
3	GFR diminué modérément	30 – 59	4,3
4	GFR fortement diminué	15 – 29	0,2
5	Insuffisance rénale	< 15 (ou sous dialyses)	0,1*

GFR : *glomerular filtrate rate*, taux de filtration glomérulaire ; Les stades de 1 à 5 indique les patients atteints de CKD classés en fonction de leur GFR.

Le GFR estimé (eGFR) ou mesuré (mGFR) et l'albuminurie sont couramment utilisés comme outils de diagnostic des CKD<sup>43</sup>. Néanmoins, ces marqueurs demeurent limités. En effet,

l'eGFR peut diminuer en l'absence d'albuminurie élevée<sup>43</sup> et des symptômes de la maladie rénale diabétique peuvent être présents chez les patients normo-albuminuriques, y compris ceux présentant des eGFR normaux<sup>44</sup>.

A nouveau, l'identification des patients à haut risque CV, *via* de nouveaux marqueurs plus sensibles et spécifiques des maladies rénale diabétiques, pourrait conduire à un traitement plus précoce, avant même que des lésions structurelles irréversibles ne se produisent. Cette approche pourrait également contribuer à une utilisation plus efficace des ressources médicales en ciblant les patients qui pourraient bénéficier le plus d'une intervention thérapeutique ou chirurgicale.

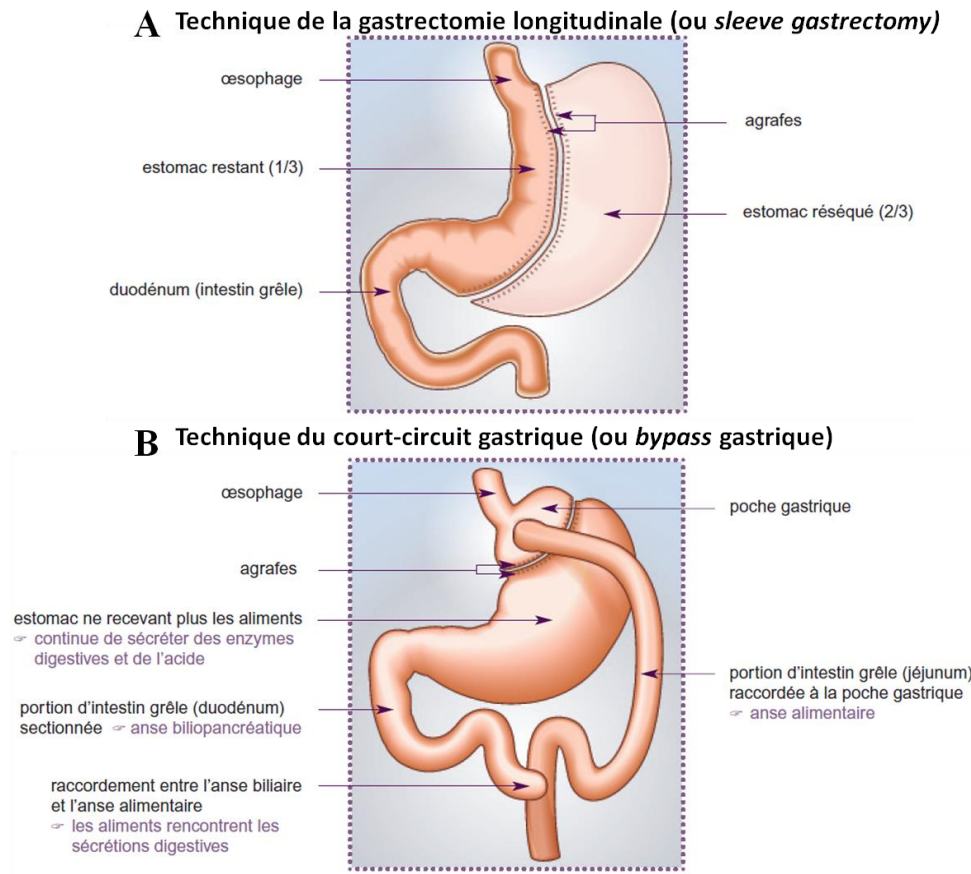
### **II.1.3 L'obésité et les dyslipidémies mixtes**

L'obésité est très souvent associée à un état dyslipidémique à forte incidence CV. Par ailleurs, la prévalence des patients obèses dans le monde augmente chaque année<sup>45,46</sup>. L'obésité est un facteur de risque indépendant de MCV, mais étroitement liée à d'autres facteurs de risque tels que les CKD ou encore le DT2<sup>47,48</sup>.

L'indice de masse corporelle constitue une variable anthropométrique simple permettant d'estimer l'adiposité des individus en fonction de leur poids (kg) et de leur taille (m). Un IMC élevé (> 30 kg/m<sup>2</sup> pour une obésité de classe I, > 35 kg/m<sup>2</sup> pour une obésité de classe II et > 40 kg/m<sup>2</sup> pour une obésité morbide) augmente le risque d'infarctus du myocarde et d'insuffisance coronarienne. Il est important de noter qu'il existe une hétérogénéité dans la population obèse. En effet, les patients obèses ne sont pas égaux face au risque de MCV et le clinicien doit prendre en compte plusieurs facteurs de risque définis sous le terme de syndrome métabolique pour dépister les patients les plus à risque<sup>49</sup>. Le syndrome métabolique a été défini par plusieurs organisations tel que l'organisation mondiale de la santé ou encore le « *National Cholesterol Education Program American Heart Association* »<sup>50,51</sup>, permettant de définir des critères de diagnostic : circonférence de la taille pour les hommes > 102 cm et pour les femmes > 88 cm; triglycérides à jeun  $\geq$  1,7 mmol/L, HDL cholestérol < 1,0 mmol/L pour les hommes et < 1,3 mmol/L pour les femmes ; pression artérielle > 130/85 mmHg ; et glycémie à jeun  $\geq$  6,1 mmol/L<sup>51,52</sup>. En outre, la définition du syndrome métabolique et son diagnostic suscite beaucoup de questionnements chez les chercheurs, et la recherche de nouveaux marqueurs permettant d'identifier les sujets à risque élevé de complications métaboliques et de MCVs est devenu l'un des sujets principaux de recherche<sup>51</sup>.

La chirurgie bariatrique est aussi appelée chirurgie métabolique car elle vise à manipuler chirurgicalement un organe ou un système d'organes normaux en vue d'obtenir un résultat biologique susceptible d'améliorer la santé. Actuellement, la chirurgie bariatrique apparaît comme l'alternative thérapeutique la plus efficace chez les patients souffrant d'obésité morbide ( $IMC > 40 \text{ kg/m}^2$ )<sup>53</sup>. Cette chirurgie consiste à restreindre l'absorption des aliments, diminuant, de fait, l'apport calorique journalier. Il existe plusieurs techniques de chirurgie dont les techniques restrictives qui visent à réduire la capacité gastrique et/ou à réduire la vitesse de vidange de l'estomac afin d'obtenir un sentiment de satiété plus rapidement (anneau gastrique ajustable, gastrectomie longitudinale appelée « *sleeve* »). Il existe également les techniques mixtes permettant la création d'un système de dérivation dans le tube digestif afin de diminuer l'absorption des éléments nutritifs par l'intestin conduisant à une malabsorption (le by-pass gastrique ou court-circuit gastrique)<sup>54</sup> (**Figure 1**). En A de la figure 1, est représenté la technique de gastrectomie longitudinale qui consiste à retirer environ les 2/3 de l'estomac, notamment, la partie contenant les cellules qui secrètent l'hormone stimulant l'appétit (ghréline). L'estomac est réduit à un tube vertical et les aliments passent rapidement dans l'intestin. Puis en B de cette même figure, est représenté la technique du court-circuit gastrique qui permet de diminuer à la fois la quantité d'aliments ingérés et l'assimilation de ces aliments par l'organisme, grâce à un court-circuit d'une partie de l'estomac et de l'intestin. Les aliments vont directement dans la partie moyenne de l'intestin grêle et sont donc assimilés en moindres quantités<sup>54</sup>.

Outre sa grande efficacité à réduire l'IMC, la chirurgie bariatrique réduit également les complications métaboliques associées à la pathologie, y compris les dyslipidémies, la résistance à l'insuline (DT2) et le risque CV associé au surplus de masse grasseuse<sup>55</sup>. En revanche, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent mal définis et l'efficacité de la chirurgie bariatrique demeure hétérogène selon le type des interventions.



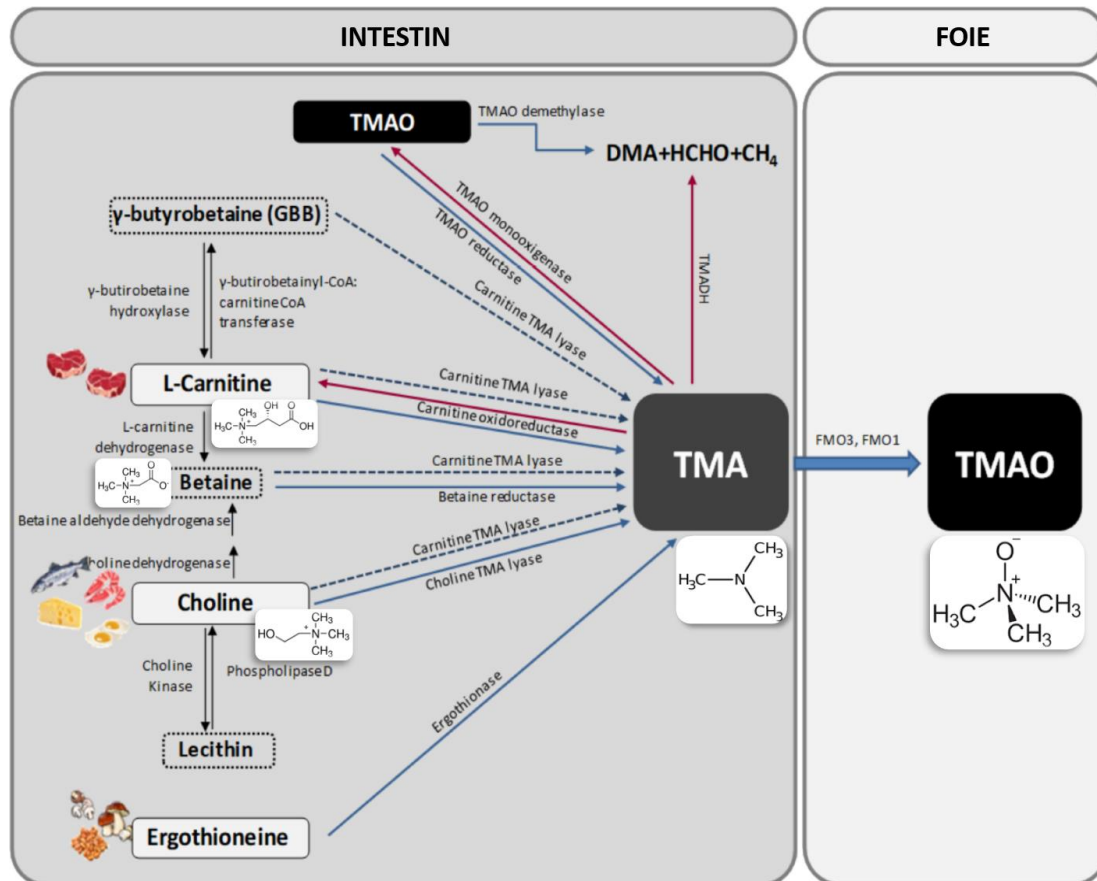
**Figure 1 : Représentation des techniques de chirurgie bariatrique appliquée dans ce projet de recherche. En A : technique de gastrectomie longitudinale, aussi appelé « *sleeve* gastrectomie ». En B : technique du court-circuit gastrique, aussi appelé « *bypass* gastrique »<sup>54</sup>.**

## II.2 Les nouveaux marqueurs de risque cardiovasculaire au-delà des lipides

### II.2.1 Le N-oxyde de triméthylamine (TMAO)

L'alimentation fait partie des facteurs influençant les MCVs. En effet, l'athérosclérose et les MCVs peuvent être associées à des altérations du métabolisme du microbiote intestinal et à la capacité bactérienne à produire des composants bioactifs<sup>56</sup>. Cela suggère que le ciblage sanguin de composés issus du microbiote intestinal pourrait aider au diagnostic des maladies cardio-métaboliques. Le microbiote intestinal joue un rôle métabolique central et relie le métabolisme des nutriments aux molécules associées aux maladies chroniques. Parmi ces molécules, le TMAO a retenu l'attention en raison de son rôle potentiel en tant que promoteur de l'athérosclérose, des maladies CVs et rénales<sup>57,58</sup>. Le TMAO a été découvert en tant que métabolite dépendant du microbiote intestinal favorisant l'inflammation vasculaire. Il a été démontré qu'il contribuait à l'athérosclérose et qu'il était étroitement associé au risque de MCV<sup>59</sup>.

Le TMAO est issu de l'oxydation de la triméthylamine (TMA) produite par le microbiote intestinal à partir de la bétaïne, de la L-carnitine et de son métabolite, la  $\gamma$ -butyrobétaïne (GBB), ou de la choline, phosphocholine ou autres composés contenant de la choline présents dans le régime alimentaire<sup>58</sup> (Figure 2).



**Figure 2 : Métabolisme du TMAO.** La triméthylamine (TMA) se forme dans la lumière intestinale lorsque le microbiote intestinal métabolise la carnitine, la choline et des composés contenant de la choline dans le régime alimentaire. La TMA peut être absorbée par l'intestin et délivrée au foie où les isoformes 1 et 3 de la flavine mono-oxygénase (FMO) le convertissent en TMAO. (DMA : diméthylamine ; HCHO : formaldéhyde ; TMADH : triméthylamine déshydrogénase ; CoA : coenzyme A)<sup>60</sup>.

La choline peut être trouvée dans de nombreux aliments, principalement d'origine animale en tant que choline libre ou faisant partie de plusieurs composés (phosphatidylcholine, phosphocholine, sphingomyéline, ...). L'un des principaux composés contenant de la choline est la phosphatidylcholine, également appelé lécithine. La lécithine peut être convertie en choline par l'enzyme phospholipase D<sup>61</sup>. La choline est transformée en TMA par l'action de l'enzyme choline TMA lyase, tandis que la bétaïne, qui se trouve principalement dans les plantes, est réduite en TMA par la bétaïne réductase *via* une réaction d'oxydo-réduction dans laquelle elle agit comme accepteur d'électrons. La bétaïne joue également un rôle important en tant que donneur de



méthyle dans la voie de la bétaine homocystéine méthyltransférase. Alternativement, la choline peut être transformée en bétaine par l'action séquentielle de deux enzymes : la choline déshydrogénase et la bétaine aldéhyde déshydrogénase<sup>61</sup> (**Figure 2**).

Outre la choline, la L-carnitine est l'autre principal précurseur de la TMA. La carnitine oxydoréductase est la principale enzyme responsable de la conversion de la L-carnitine en TMA<sup>62</sup>. La carnitine ne se trouve que dans les aliments en tant que stéréoisomère L, et se trouve en grande quantité dans les produits d'origine animale. La carnitine peut également être transformée en d'autres précurseurs, à savoir la bétaine, par l'action de la L-carnitine déshydrogénase, et la GBB par l'enzyme  $\gamma$ -butyrobétainyl-CoA: carnitine CoA transférase (**Figure 2**). Il est également important de noter que la carnitine joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique. Elle a pour fonction principale le transfert d'acides gras à chaîne longue vers les mitochondries pour une  $\beta$ -oxydation ultérieure. Les défauts de biosynthèse de la carnitine ne se traduisent pas systématiquement par de faibles taux plasmatiques de carnitine. La carnitine est accumulée par les cellules et retenue par les reins en utilisant un transporteur de cations organiques à haute affinité spécifique de la carnitine (OCT2). Des défauts du transporteur de carnitine entraînent une carence primaire en carnitine caractérisée par une diminution de l'accumulation de carnitine intracellulaire, une augmentation des pertes de carnitine dans les urines et un faible taux sérique de carnitine<sup>63</sup>.

L'ergothionéine est une autre source de TMA. Il s'agit d'une amine biogène (un dérivé de l'histidine) qui peut être obtenue à partir de sources alimentaires telles que les champignons, certains produits carnés (principalement le foie) et plusieurs types de haricot<sup>61</sup> (**Figure 2**).

Enfin, le TMAO et la TMA peuvent également être trouvés de manière naturelle dans certains aliments comme le poisson<sup>61</sup>. Environ 50% du TMAO ingéré est absorbé sous forme inchangée puis excrété par les urines. Les 50% restants sont convertis en TMA dans l'intestin par l'action de la TMAO réductase<sup>61</sup>. La TMA peut à nouveau être oxydée en TMAO par l'action de la TMA mono-oxygénase, présente dans certains microorganismes intestinaux<sup>64,65</sup> (**Figure 2**). De plus, certaines bactéries sont capables d'appauvrir le TMA et le TMAO en formant de la diméthylamine et du formaldéhyde par l'action des enzymes triméthylamine déshydrogénase et TMAO déméthylase<sup>65</sup>.

La majeure partie du TMA ingéré ou formé dans l'intestin est rapidement absorbée dans la circulation sanguine puis oxydée en TMAO *via* les flavines mono-oxygénases (FMO) hépatiques (**Figure 2**)<sup>58</sup>. La TMA (95%) est transformée en TMAO dans le foie par les isoformes

1 (minoritaire) et 3 (majoritaire) des FMOs (FMO1 et FMO3)<sup>66</sup>. Le TMAO est ensuite sécrété dans la circulation puis éliminé par les reins *via* le transporteur de cations organiques 2 (OCT2) dans les urines à 95% (4% dans les fèces et 1% dans l'haleine)<sup>58</sup>. Le TMAO peut également être métabolisé en diméthylamine, formaldéhyde, ammoniacque et méthane par certaines bactéries méthanogènes contenant l'enzyme TMAO déméthylase<sup>65</sup>.

Les concentrations circulantes de TMAO présentent de grandes variabilités inter-individus, car elles dépendent du régime alimentaire, de la composition du microbiote intestinal, des fonctions hépatique et rénale. De plus, il est décrit que le transporteur de cations organiques 2 situé sur la membrane basolatérale des cellules du tubule rénal est le transporteur d'absorption clé du TMAO et peut également être un facteur déterminant de sa variabilité. Il est également important de noter que les FMOs sont régulées par les hormones stéroïdiennes. En effet, il a été montré que la 17 $\beta$ -estradiol joue un rôle fondamental dans la régulation de la transcription du gène *FMO3*<sup>67</sup>. L'expression de *FMO3* est réduite chez l'homme par rapport aux femmes<sup>66</sup>.

Pour mieux comprendre le rôle du TMAO dans les MCVs, de nombreuses études ont été menées chez l'animal et chez l'homme et ont montré une relation directe entre l'augmentation des taux plasmatiques de TMAO et l'augmentation du risque de MACE<sup>59,68</sup>. Les mécanismes sous-jacents par lesquels le TMAO contribue aux MCVs ne sont pas entièrement compris. Certaines études décrivent une relation entre le transport inverse du cholestérol (RCT) et le TMAO, celui-ci entraînant une diminution du RCT par les HDL<sup>9</sup>. Le TMAO pourrait agir sur les voies pro-athérogènes en favorisant la formation des cellules spumeuses et en augmentant les récepteurs piègeurs de macrophage, diminuant ainsi l'épuration du cholestérol des macrophages spumeux présent dans la plaque d'athérome induit par l'apolipoprotéine A-I<sup>69</sup>. Des études antérieures ont également montré que l'impact du TMAO sur l'athérosclérose serait étroitement lié aux modifications du métabolisme des acides biliaires<sup>70</sup>. Le TMAO réduirait la synthèse des acides biliaires et les transporteurs des acides biliaires du foie, diminuant ainsi efficacement le pool d'acide biliaire<sup>71</sup>. Le récepteur farnésioïde X (FXR) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires qui agit comme un capteur des taux intracellulaires d'acides biliaires dans le foie et l'intestin<sup>72</sup>. L'expression de la FMO3 hépatique est régulée positivement par les acides biliaires alimentaires *via* une voie médiée par FXR<sup>66</sup>. Par conséquent, une supplémentation alimentaire en TMAO pourrait inhiber la synthèse des acides biliaires. L'altération de la synthèse et de la sécrétion des acides biliaires étant liées à un risque accru de MCV, les actions directes et

indirectes du TMAO sur la synthèse et l'excrétion des acides biliaires pourraient représenter un mécanisme potentiel par lequel le TMAO exerce son effet pro-athérogène.

## II.2.2 Les arginines méthylées

Les métabolites méthylés de l'arginine, comme la SDMA et l'ADMA, ont été identifiés comme de potentiels marqueurs d'intérêt dans le risque CV<sup>73</sup>. De nombreuses MCVs sont associées à une altération de la vaso-relaxation des vaisseaux dépendants de l'endothélium. Cela a été démontré chez des lapins et des singes hypercholestérolémiques, ainsi que chez des patients atteints de coronaropathie ou de facteurs de risque typiques prédisposant à cette affection. La vaso-relaxation dépendante de l'endothélium est également anormale dans d'autres états pathologiques tels que l'insuffisance cardiaque, le diabète et l'hypertension<sup>74</sup>. Il existe vraisemblablement une perte de production endothéliale et / ou une variation de biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) dans ces troubles.

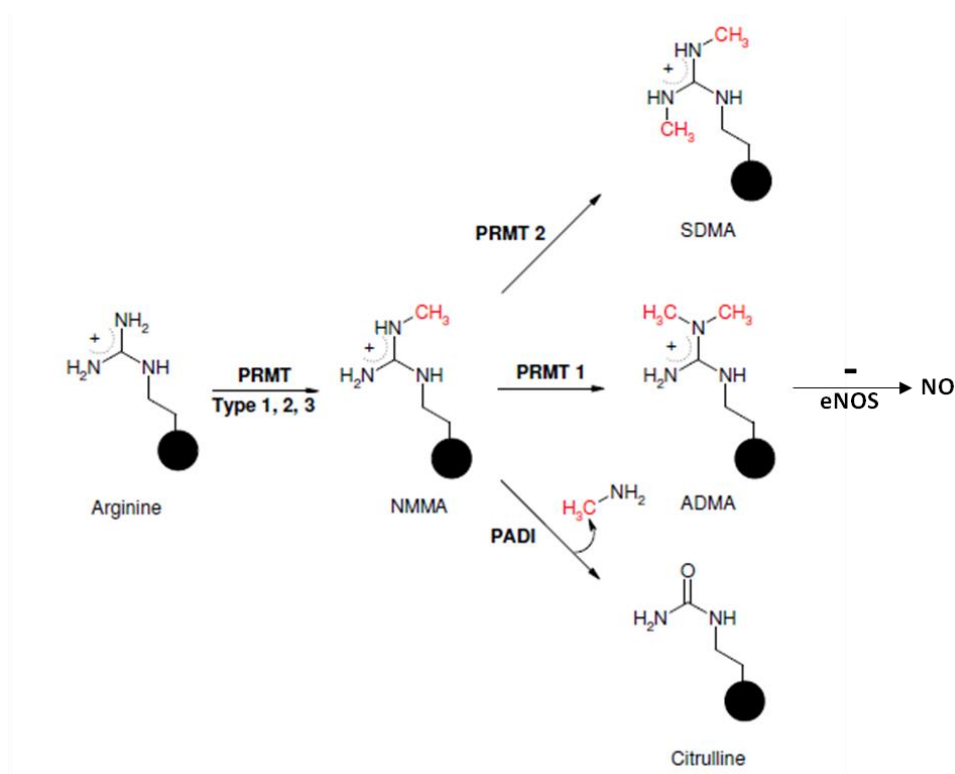
L'arginine est un acide aminé à forte occurrence dans les protéines (> 4%) et qui peut subir des modifications post-traductionnelles telles que la méthylation. Sous l'action d'une enzyme spécifique, la protéine méthyltransférase (PRMT), elle peut être transformée en N-monométhylarginine (NMMA) puis en ADMA et SDMA<sup>75</sup> (**Figure 3**). Ces métabolites sont ensuite libérés dans la circulation sanguine après protéolyse des protéines porteuses. L'ADMA agit comme un inhibiteur compétitif endogène de la monoxyde d'azote synthétase endothéliale (eNOS), mais également de la monoxyde d'azote synthase neurale et de la monoxyde d'azote synthase inductible. Elle bloque ainsi la formation du NO. Les monoxydes d'azote synthétases endogènes et le stress oxydatif sont considérés comme les facteurs les plus importants du système CV<sup>76</sup>. En effet, ils jouent un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire et sont présents dans les cellules endothéliales vasculaires. En outre, ils peuvent être modulés par plusieurs stimuli tant physiques qu'hormonaux.

L'ADMA initie et favorise les processus impliqués dans les pathologies CVs et est associée à l'insuffisance rénale, l'hypertension et l'hypercholestérolémie<sup>75,77</sup>.

Les taux plasmatiques d'arginine et de méthylation d'arginine sont associés aux MCVs et aux événements CVs indésirables. Des taux élevés d'ADMA et de SDMA ainsi que des concentrations réduites de NMMA sont des facteurs prédictifs de MCV, et prédisent les risques à long terme d'événements cardiaques indésirables majeurs (crise cardiaque, accident vasculaire cérébral ou décès), même après ajustement des facteurs de risque traditionnels (tabagisme,

inactivité physique)<sup>10</sup>. Wang et ses collaborateurs ont défini une quantification intégrée de la méthylation de l'arginine sous la forme d'un « indice de méthylation de l'arginine » [ArgMI = (ADMA + SDMA) / NMMA]. Dans cette étude<sup>10</sup>, l'indice de méthylation de l'arginine a fourni une meilleure prédiction des événements cardiaques indésirables majeurs chez les patients stables subissant une évaluation, et a considérablement ajouté à l'utilité pronostique des facteurs de risque traditionnels. Ces résultats ont suggéré que la méthylation de l'arginine apporte une contribution importante à la progression de la maladie, au-delà de l'inhibition directe de la monoxyde d'azote synthétase<sup>10</sup>.

Seulement 20% de l'ADMA sont excrétés par les urines ou métabolisés par la diméthylarginine diméthyl-aminohydrolase (DDAH)<sup>78</sup> en citrulline. L'ADMA peut également être dégradée en acide diméthylguanidine valérique *via* l'alanine-glyoxylate aminotransférase 2 (AGXT2). Böger et ses collègues ont suggéré qu'une concentration élevée d'ADMA serait un marqueur d'intérêt pour la prévision des maladies CVs<sup>79</sup>, contrairement à la SDMA, également issue de la dégradation des protéines mais qui n'a aucun effet sur l'activité des monoxydes d'azote synthétases. La SDMA est presque totalement excrétée par les urines<sup>80,81</sup>.



**Figure 3 : Métabolisme simplifié de l'ADMA.** L'arginine est méthyliée sous l'action de plusieurs enzymes, la protéine arginine méthyltransférase (PRMT 1, 2, 3) et la peptidyl arginine déiminase (PADI). L'ADMA est un inhibiteur endogène de eNOS formant le monoxyde d'azote messenger intra/extracellulaire<sup>76,77</sup>.

L'excrétion de l'ADMA de la cellule vers le plasma se réalise par l'intermédiaire de transporteurs cationiques d'acides aminés présent dans la membrane plasmique de la cellule. La clairance du compartiment plasmatique se produit de deux manières ; 1) par l'excrétion rénale, et 2) l'absorption par les cellules *via* le transporteur cationique d'acides aminés. En effet, l'activité des transporteurs cationiques d'acides aminés est impliquée à la fois dans l'excrétion et l'absorption de l'ADMA et joue un rôle important dans le transport intracellulaire et inter-organe de l'ADMA.<sup>82</sup>

Le rein et le foie sont des organes importants dans l'élimination de l'ADMA du plasma. Le transport inter-organes de l'ADMA peut avoir des conséquences graves sur les maladies et les affections cliniques associées à une altération du métabolisme de l'ADMA<sup>82</sup>.

## **II.3 Les méthodes d'analyses**

Cette section vise à présenter les techniques analytiques utilisées durant ce projet de recherche avant de les présenter de façon intégrée à nos études. Pour la réalisation des travaux présentés, nous avons développé une étape de préparation des échantillons constituée de l'extraction des molécules des matrices biologiques suivie de modifications chimiques des composés à analyser (dérivation). Cette étape est essentielle à la séparation des composés d'intérêts par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) avant leur ionisation par l'intermédiaire d'une source électrospray (ESI). Les composés sont ensuite détectés par spectrométrie de masse (MS) en tandem (MS/MS) ce qui permet une analyse sensible et précise.

### **II.3.1 La chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC)**

La chromatographie est une technique analytique séparative et/ou préparative où les espèces moléculaires sont séparées en fonction de leur affinité avec deux phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. Cette technique est utilisée principalement pour identifier, quantifier et séparer les composants d'un mélange en utilisant une pression élevée. En UHPLC, des tailles de particules inférieures à 2  $\mu\text{m}$  peuvent être utilisées, fournissant une meilleure séparation que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) où la taille de particules est supérieure à 2  $\mu\text{m}$ . Les particules plus petites nécessitent des pressions de pompe plus élevées (100 MPa pour l'UHPLC *versus* 40 MPa pour l'HPLC), rendant cette technique d'analyse rapide et résolutive.

La résolution chromatographique est basée sur la courbe de Van Deemter qui correspond à une équation mathématique permettant de comprendre la forme des pics chromatographiques, normalement de forme gaussienne. Cette courbe montre qu'il est possible d'augmenter le débit de solvants sur les colonnes de faible diamètre de particule (inférieur à 2  $\mu\text{m}$ ) et d'augmenter la vitesse d'analyse, sans altérer les performances chromatographiques. L'avènement de l'UHPLC a suscité le développement instrumental d'un nouveau système de chromatographie en phase liquide par la société d'instruments et de logiciels de laboratoire d'analyses « Waters Corporation » : la chromatographie liquide ultra performante (UPLC™). Cette technologie tire avantage des performances de séparation de l'UHPLC (en limitant les volumes morts) et est compatible avec les pressions générées (de l'ordre de 55 à 100 MPa). L'UPLC™ augmente ainsi la résolution des pics chromatographiques, la vitesse d'élution des composés et la sensibilité des systèmes d'analyses couplés à la chromatographie. Pour la réalisation de ce projet, nous avons utilisé la technologie Waters (Waters Corporation, Milford, MA, États-Unis), qui en 2004 a introduit la chromatographie liquide ultra performante (UPLC™) dans le domaine de la séparation analytique<sup>83</sup>, aussi appelé UHPLC. Nos appareils sont équipés de la technologie UPLC™ les colonnes de chromatographie sont garnies de particules sphériques de 1,7  $\mu\text{m}$  de diamètre constituant la phase stationnaire et fonctionnent à des pressions pouvant atteindre 15 000 psi (103,4 MPa).

Les colonnes de chromatographie permettent la séparation de composés en fonction de la différence d'affinité existant entre les molécules, la phase mobile (solvant d'élution), qui entraîne les composés, et la phase stationnaire (particules solides composant la colonne). En effet, en fonction de l'affinité entre les solutés et la phase stationnaire ou la phase mobile, les molécules du mélange migrent à des vitesses différentes et sont ainsi séparées.

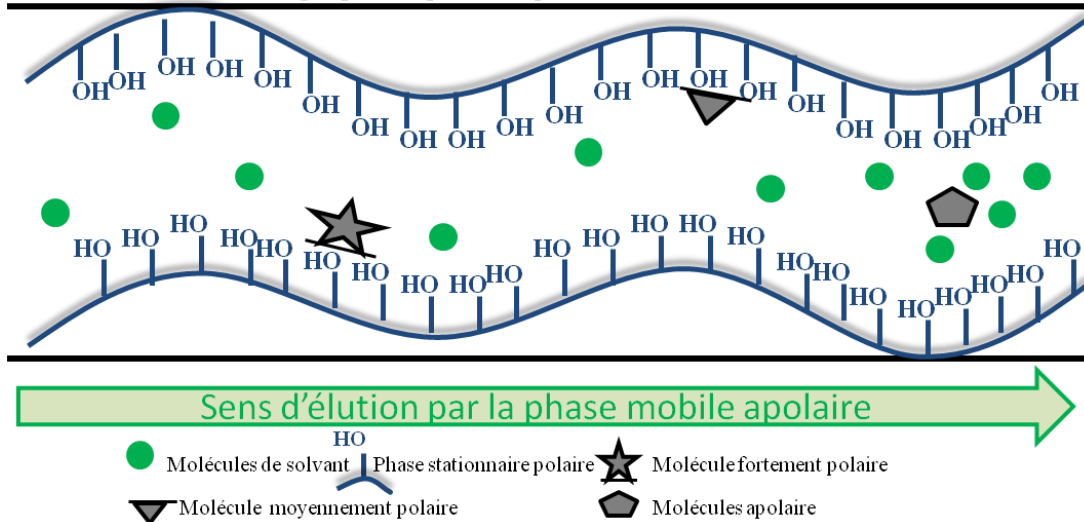
Les techniques chromatographiques peuvent être classées selon le type de phase stationnaire et mobile. La phase stationnaire est placée dans une colonne puis est traversée par une phase mobile sous l'effet d'une pression extérieure. En considérant la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules, les séparations chromatographiques sont classées en 5 principaux types 1) chromatographie de partage en phase normale ou inversée, 2) chromatographie d'adsorption en phase d'interaction hydrophile (HILIC), 3) chromatographie d'exclusion stérique, 4) chromatographie sur échangeur d'ions et 5) électrochromatographie. Dans ce projet nous nous intéresserons aux chromatographies 1) et 2).

## A. La phase normale

La chromatographie liquide en phase normale (NPLC, « *normal-phase liquid chromatography* ») consiste à séparer différentes molécules en fonction de leur polarité et en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. La séparation des composés repose sur l'interaction entre les particules à groupements polaires présentes à la surface de la phase stationnaire de la colonne et leur solubilité dans la phase mobile qui est apolaire. L'interaction avec la phase stationnaire augmente avec l'utilisation de phases mobiles à base de mélanges de solvants non polaires/polaires. Il s'agit d'un mécanisme de compétition entre la rétention d'un soluté sur la phase stationnaire et l'élution de celui-ci par la phase mobile. Cette chromatographie est une technique de séparation très puissante en raison du grand nombre de solvants qui peuvent être utilisés pour obtenir une sélectivité idéale lors d'une séparation. Il s'agit de faire passer un solvant non polaire ou modérément polaire dans la colonne. Les solutés les plus retenus (les plus polaires) dans la phase stationnaire sont élués en dernier alors que les solutés les moins retenus (les plus apolaires) sont élués en premier. Différents types d'interactions peuvent être mis en jeu avec la phase normale tels que les liaisons hydrogène, les interactions dipôle-dipôle et les interactions acide-base.

Les phases stationnaires utilisées pour une NPLC sont des phases polaires. La silice est couramment utilisée grâce à son groupement silanol présent en surface des grains de silice (Si-OH) (**Figure 4**). La surface d'interaction des particules de la phase stationnaire pouvant interagir avec les composés à séparer est également un paramètre à prendre en compte pour caractériser les différents types d'interactions physico-chimiques existants. Pour cela il est important de connaître le diamètre des particules de silice et le diamètre des pores. Chaque type de silice possède ses propres propriétés de séparation. Dès lors, il est possible de choisir entre trois classes de silice fonctionnalisée : 1) soit accepteur de protons, 2) soit donneuse de proton, 3) soit à l'origine d'interactions dipôle-dipôle, c'est-à-dire des interactions entre des molécules possédant 2 charges électriques (positive et négative, aussi appelée « zwitterion »). Les silices fonctionnalisées les plus utilisées pour la NPLC sont la silice cyano-propylée, la silice amino-propylée et la silice 1,2-hydroxypropylée (diol). D'autres groupements peuvent aussi être utilisés pour la fonctionnalisation de la silice pour des applications plus spécifiques, mais ceux-ci suffisent en général. La colonne diol est une colonne acide, la colonne amino-propylée est une colonne plutôt basique alors que la colonne cyano-propylée permet des interactions dipôle-dipôle modérées.

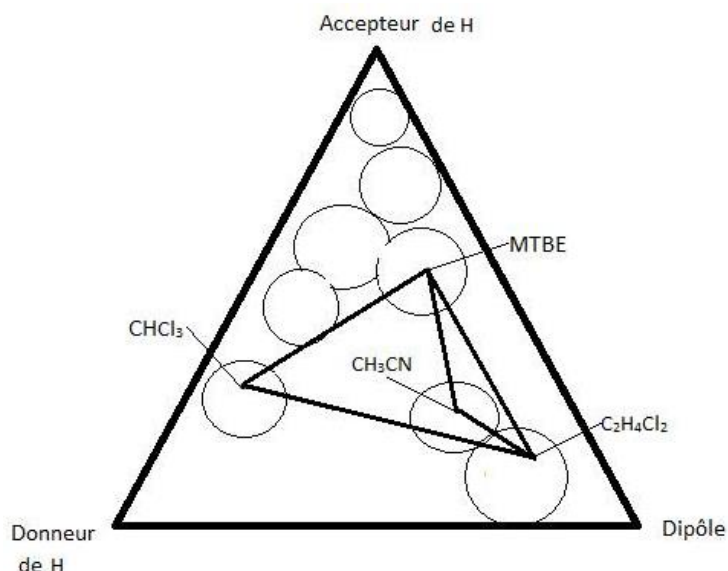
### Colonne de chromatographie liquide en phase normale



**Figure 4 : Représentation schématique de la phase stationnaire silice présentant ses groupements silanols (-OH). Interaction ionique entre les groupements silanols et les molécules polaires.**

Les solvants peu visqueux (ex : acétonitrile) sont fréquemment utilisés en NPLC afin de pouvoir appliquer un débit de phase mobile plus élevé dans la colonne. Le solvant doit absolument être moins polaire que les molécules pour éviter une élution directe de ces dernières. En général, il est possible de moduler la polarité de l'éluant en faisant varier la polarité du solvant A. En effet, il est plus simple d'utiliser un éluant binaire puisque la polarité variera en fonction de la quantité d'un solvant polaire ajouté (solvant B). Un autre facteur important concernant la phase mobile est la force du solvant. Puisque la technique est basée sur les différentes interactions entre les molécules, la phase mobile et la phase stationnaire, il est important d'ajuster la force de l'éluant que l'on définit par l'affinité de la phase mobile pour la phase stationnaire. Ainsi, un solvant dont la force d'élution est supérieure à un autre, aura plus de facilité à entraîner une molécule dans la phase mobile, puisque ses interactions seront plus fortes avec la phase stationnaire<sup>84</sup>. La sélectivité du solvant est l'ensemble des interactions acide-base, dipôle-dipôle et liaisons hydrogènes entre les molécules de solvant et les composés à séparer. Il y a un changement dans la sélectivité du solvant quand les interactions moléculaires entre la phase stationnaire, le soluté et la phase mobile changent brusquement avec le changement de solvant. La sélectivité du solvant est basée sur le triangle de sélectivité de Snyder (**Figure 5**), qui guide le choix du solvant ou des solvants à choisir ainsi que la phase stationnaire pour optimiser la séparation de la molécule<sup>85</sup>.



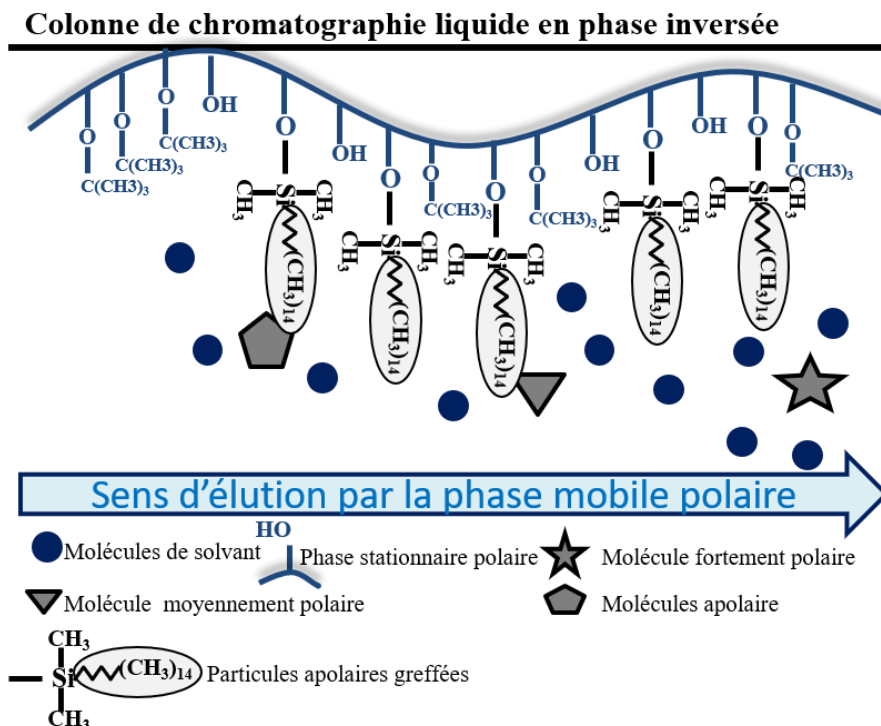


**Figure 5 : Triangle de Snyder.** Chaque apex du triangle représente une caractéristique d'un solvant, soit accepteur de proton, donneur de proton ou ayant un dipôle. Les solvants sont classés dans le triangle de façon à les catégoriser selon les interactions possibles du solvant avec la molécule. Pour changer les interactions entre le solvant et les molécules, il suffit de passer d'un solvant près d'un apex du triangle vers un solvant qui se situe plus près d'un autre apex<sup>85</sup>.

## B. La phase inverse

La chromatographie liquide en phase inverse (RPLC, « *reversed-phase liquid chromatography* ») est considérée comme la méthode de séparation en chromatographie liquide la plus fréquemment utilisée. Cela résulte de son domaine d'application couvrant une diversité importante de molécules de par leurs tailles, leurs polarités et leurs capacités d'ionisation<sup>86,87</sup>. Il s'agit d'une chromatographie de partage en phases inversées visant à séparer les molécules d'un mélange en fonction de leur polarité. Les composés polaires sont élués en premier à l'inverse d'une séparation par chromatographie en phase normale. La RPLC est composée d'une colonne de phase stationnaire soit silice ou de particules hybrides fonctionnalisées avec des acides carboxyliques et des groupes alkyles à longues chaînes. Ces particules de silice ont été greffées par des fonctions chimiques, par exemple : des chaînes alkyles de 4, 8 ou 18 atomes de carbone. Les fonctions silanols (Si-OH) qui subsistent après greffage des fonctions chimiques peuvent engendrer des interactions hydrophiles parasites, qui rendent les résultats non reproductibles surtout pour les molécules basiques. Pour éviter cela, la surface de la silice encore libre peut être recouverte par une fonction méthyle ou plus fréquemment par des triméthylsilyles (TMS), ce qui bloque les fonctions silanols libres sous la forme (Si-O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). Cette étape est appelée « *end-capping* »<sup>86</sup>.

La phase stationnaire est ainsi dite « inversée », car celle-ci, fonctionnalisée après le greffage des fonctions chimiques, devient apolaire et hydrophobe (**Figure 6**).



**Figure 6 : Représentation schématique de la phase stationnaire inversée greffée C18.** La RPLC met en jeu des interactions entre le soluté et les particules greffées à la phase stationnaire

Le mécanisme de séparation chromatographique représenté ci-dessus se produit grâce aux groupements hydrophobes constituant la (ou les) molécule(s) à séparer et qui vont interagir avec la phase stationnaire hydrophobe.

### C. La phase d'interaction hydrophile : HILIC

La chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC, « *hydrophilic interaction liquid chromatography* »), aussi appelée phase normale aqueuse, car il s'agit d'une technique de chromatographie permettant la séparation de petites molécules polaires. Celle-ci requiert l'utilisation d'une phase mobile constituée d'un solvant organique miscible dans l'eau, souvent l'acétonitrile, et d'un tampon aqueux. La séparation est le résultat d'un partage ou d'une adsorption de la molécule dans une couche enrichie d'eau sur la phase stationnaire polaire. Cette technique est complémentaire de la phase inverse, car particulièrement adaptée à l'analyse des solutés polaires et ionisés, difficiles à retenir en phase inverse<sup>88</sup>.

La chromatographie HILIC associe trois modes de séparation, soit sur phase normale, sur phase inverse ou sur phase ionique. Le nom « HILIC » a été proposé par Dr. Andrew Alpert en 1990 qui a publié sur la séparation de composés polaires tels que les peptides et les acides nucléiques. Il fut le premier à observer que l'ordre d'élution des composés sur une phase stationnaire hydrophile est inversé par rapport à celui d'une phase stationnaire apolaire. Depuis, une multitude de modes de séparation avec diverses molécules polaires a été réalisée<sup>89</sup>.

Le mécanisme de séparation mis en jeu entre le composé polaire et la phase stationnaire polaire est un phénomène d'adsorption au sein d'une couche d'eau. Alpert a considéré que les interactions dipôle-dipôle pourraient être responsables du partage des solutés entre les multicouches. Cependant, des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions électrostatiques peuvent également interagir avec la phase stationnaire HILIC, rendant ce mode complexe, notamment dans la prédiction des ordres d'élution.

Il existe plusieurs compositions de phase stationnaire HILIC. La plupart des phases stationnaires sont des particules de silice classiques, ou des particules hybrides fonctionnalisées ou non. La silice vierge est fréquemment utilisée et permet une bonne rétention des composés positivement chargés en raison des interactions électrostatiques liées aux groupements silanols principalement chargés négativement à pH basique sachant que le point de neutralité de la silice est à 2,5<sup>84,90</sup>. En effet, en milieux aqueux, les groupements silanols possèdent des propriétés chimiques particulières, de manière générale, le pH joue un rôle important pour déterminer la réactivité de la surface silice. En condition basique l'oxyde de silicium, subit une perte de proton, le groupement silanol est alors chargé négativement, jouant le rôle d'un échangeur de cations. Cependant ce groupement peut aussi être de charge nulle en milieu acide et l'oxyde de silicium est alors protoné, chargé positivement et peut donner lieu à des phénomènes d'échange d'anions. Tout dépend de la valeur du point de neutralité et des constantes de réactions, la silice possédant une valeur de point de neutralité environ à 2,5<sup>84</sup>, la réaction de protonation apparaît donc peu probable. Ces groupements chargés négativement vont interagir avec les molécules les plus polaires chargées positivement par interaction ionique. Les molécules apolaires vont donc être éluées en premier, tandis que les molécules moyennement polaires et fortement polaires seront retenues sur la colonne et ainsi éluées par la suite avec un solvant plus polaire. Contrairement à la phase normale, ici les modifications apportées à la silice sont polaires, afin de pouvoir interagir avec les petites molécules polaires et permettre leur séparation sur colonne chromatographique.

La phase mobile est très importante en mode HILIC car elle joue un rôle important sur les propriétés physico-chimiques (acido-basiques) des molécules à séparer en interactions avec la phase stationnaire. La phase mobile comprend des solvants organiques polaires miscibles à l'eau comme l'acétonitrile, et peut contenir des additifs ioniques afin de contrôler le pH et la force ionique de celle-ci (ex : acétate d'ammonium, acide formique). En présence d'eau, la surface de silice présente divers stades d'hydratation, les groupements silanols peuvent être simplement hydratés s'ils sont liés qu'à une seule molécule d'eau ou la surface peut être entièrement recouverte d'une couche d'eau mono ou plurimoléculaire, aboutissant à un gel de silice fortement hydraté et dont les propriétés d'adsorption seront alors totalement masquées. C'est pourquoi la phase mobile ne doit pas dépasser 45% d'eau pour les colonnes HILIC silice non fonctionnalisées afin de ne pas altérer les propriétés physico-chimiques de celle-ci. Les sels potentiellement présents dans la phase mobile contribuent à la polarité de la molécule, ce qui joue sur la rétention de celle-ci sur la phase stationnaire. L'augmentation de la phase mobile polaire ou du tampon (si composition en sels) diminue la rétention des molécules.

En mode HILIC, le pH de la phase mobile a une grande influence sur la séparation des composés puisque les interactions sont de natures ioniques, c'est-à-dire acides ou basiques. En effet, suivant le pH de la phase mobile, certaines molécules pourront être protonées ou déprotonées en fonction de leur  $pK_a$  et pourront donc être plus ou moins solubles dans la phase mobile (et donc plus ou moins retenues par la phase stationnaire). Le pH peut également agir sur la nature de la phase stationnaire. A titre d'exemple, pour une colonne HILIC silice, les groupements silanols de la silice seront ionisés à pH 5-9 et auront donc une plus forte attraction électrostatique avec les cations (base) et une moins grande attraction envers les anions (acides) au-delà de ces pH<sup>91</sup>.

### **II.3.2 La spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique de premier ordre en recherche biomédicale car elle permet la détection de biomolécules à leurs niveaux physiologiques<sup>92</sup>. Son principe réside dans la détection et l'identification structurale d'espèces élémentaires ou moléculaires chargées (ions) en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) exprimés en Thompson (Th). Les systèmes, bien que très variés, peuvent se découper en quatre compartiments distincts (**Figure 7**) consistant en : 1) système d'introduction de l'échantillon dans le système, le plus souvent *via* un système chromatographique, 2) source d'ionisation des molécules à l'état gazeux, 3) système permettant l'analyse des ions selon leur rapport  $m/z$  *via* un ou plusieurs

analyseurs en masse et pour finir 4) système d'enregistrement des données *via* un système d'acquisition.

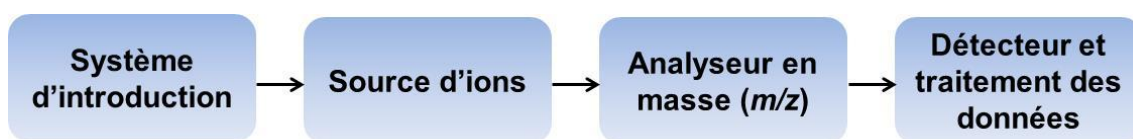


Figure 7 : Représentation schématique d'un système de spectrométrie de masse.

Ces trois dernières décennies ont été marquées par l'essor de la spectrométrie de masse dans la recherche biologique et clinique, notamment grâce au développement des sources d'ions et des analyseurs en masse et, dans une moindre mesure, grâce au développement des systèmes d'introduction<sup>92</sup>. En effet, le développement de nouvelles sources d'ionisation dites « douces » a permis l'analyse directe de nombreux composés jusqu'alors inaccessibles (protéines, peptides, oligonucléotides). Le développement des analyseurs a permis de mesurer plus rapidement, plus précisément et de façon plus sensible une large gamme de composés de poids moléculaires très variés. Enfin, les améliorations apportées aux systèmes d'introduction, essentiellement chromatographiques, ont permis de diminuer considérablement les temps d'analyse tout en améliorant la résolution et la spécificité de ces dernières.

### A. Les sources d'ionisation

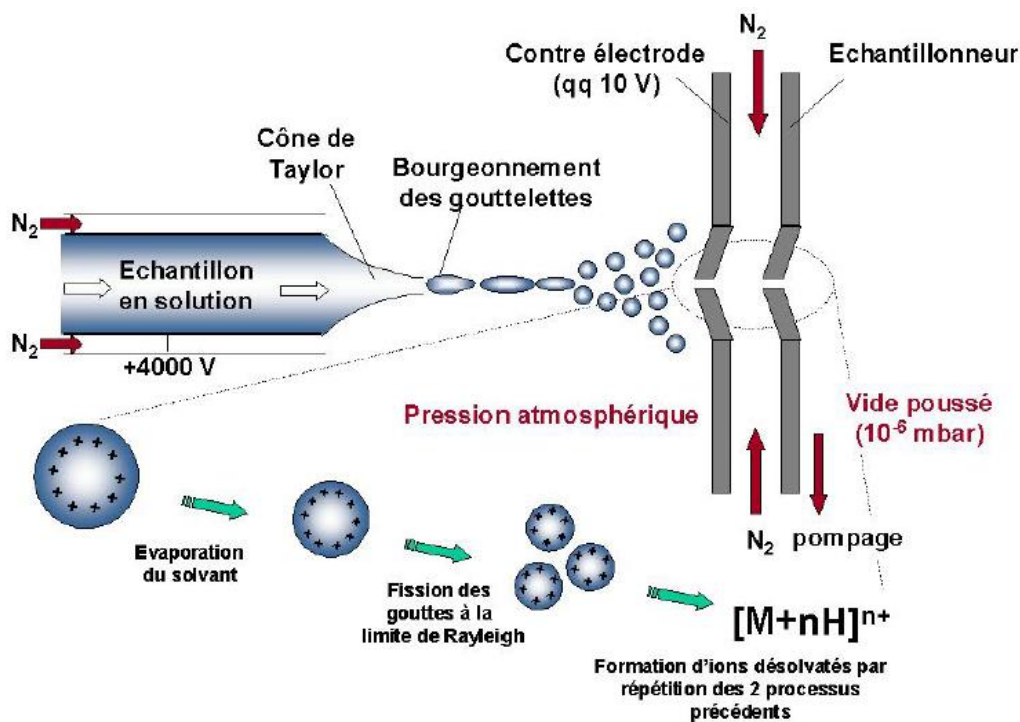
La spectrométrie de masse sépare des ions en phase gazeuse selon leur rapport  $m/z$ . Pour analyser un échantillon, ce dernier doit donc être vaporisé avant l'ionisation. Jusqu'au début des années 1980, les molécules étaient ionisées par impact électronique (EI, *electron impact*) ou ionisation chimique (CI, *chemical ionization*). Les composés devaient être à l'état gazeux et donc préalablement vaporisés, ce qui reste aisé pour les petites molécules organiques volatiles introduites par chromatographie en phase gazeuse. Cependant la plupart des molécules du vivant, polaires et thermiquement labiles, n'ont pas ces propriétés et doivent être préalablement dérivées<sup>92</sup>. L'introduction des méthodes d'ionisation dites « douces » comme la désorption laser assistée par matrice (MALDI, *matrix-assisted laser-desorption-ionization*)<sup>93</sup> et l'électrospray (ESI, *electrospray ionization*)<sup>94-96</sup> a permis l'analyse directe de biomolécules polaires et thermolabiles sans dérivation préalable. En outre, la gamme d'analyse en terme de poids moléculaires, jusqu'alors limitée, a été considérablement augmentée<sup>97,98</sup>. Ces nouvelles sources

d'ions ont ainsi permis de vaporiser des échantillons non gazeux rendant possible les couplages à l'électrophorèse capillaire et à la chromatographie en phase liquide.

Dans cette étude, nous nous intéresserons uniquement à l'ESI, qui est l'une des techniques les plus utilisées pour les couplages de chromatographie liquide et spectrométrie de masse (LC-MS, LC-MS/MS).

## B. L'électrospray (ESI)

L'ESI est l'une des techniques les plus utilisées pour les couplages LC-MS. C'est une technique d'ionisation douce fonctionnant à pression atmosphérique et permettant une faible fragmentation des ions. L'ESI fonctionne en modes positif et négatif, et permet la formation d'ions mono- et multi-chargés majoritairement de types  $[M+nH]^{n+}$  ou  $[M-nH]^{n-}$  mais d'autres adduits sont possibles ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $HCO_2^-$ ...). L'ESI transforme le composé élué dans la phase liquide en ion gazeux, en pulvérisant la solution à travers un capillaire chauffé avec courant de gaz sec ( $N_2$ ) dirigé dans le spray et soumis à une différence de potentiel de quelques kV. En effet, la solution introduite dans le capillaire porté à un potentiel élevé (entre 2,5 à 4 kV), va générer sous l'action conjuguée du champ électrique et du courant gazeux (azote), des gouttelettes chargées. Celles-ci se réduisent au fur et à mesure afin de former un cône dynamique à l'extrémité du capillaire, appelé « cône de Taylor »<sup>99</sup>. Lorsque la charge de la solution qui forme le cône de Taylor s'approche de la limite de Rayleigh, correspondant au point où les répulsions coulombiennes entre les charges égalent les forces cohésives de la tension de surface du liquide, le champ électrique intense confère aux gouttelettes une densité de charge importante. Les gouttelettes formant un filament liquide à la sortie du « cône de Taylor » finissent par se détacher et se disperser sous forme de microgouttelettes (diamètre de 1-2  $\mu m$ ). Ce phénomène permet ainsi la désorption de molécules mono-chargées et multi-chargées pour l'analyse des petites molécules et macromolécules<sup>92</sup> (**Figure 8**).



**Figure 8 : Représentation schématique d'une source électrospray en mode positif<sup>100</sup>.** À partir du cône de Taylor, des microgouttelettes sont formées par l'accumulation des charges se rapprochant de la limite de Rayleigh. Les répulsions coulombiennes excèdent les forces de cohésions des gouttelettes et ainsi forment les microgouttelettes chargées. Ce phénomène se répétant dès que les charges s'accumulent et sont à la limite de Rayleigh, des ions désolvatés finissent par se former avant leur entrée dans l'analyseur de masse.

### C. L'analyseur de masse

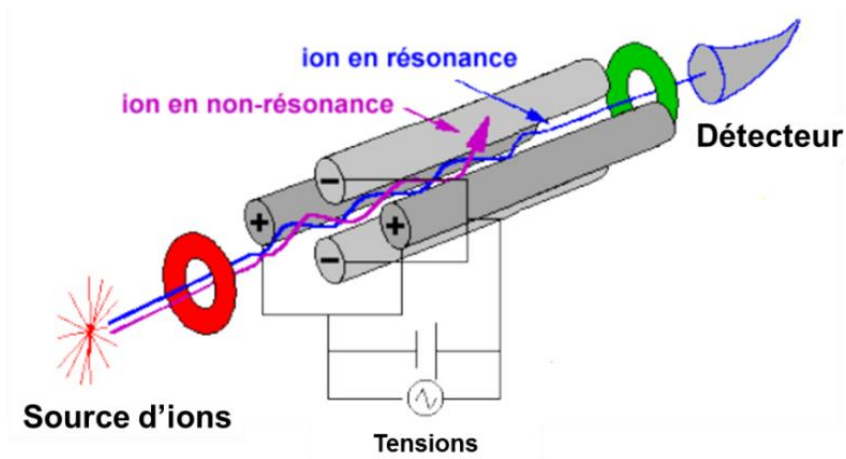
Il existe aujourd'hui une très grande variété d'analyseurs en masse dont les performances peuvent être définies en fonction des critères suivants :

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

De nombreux types d'analyseurs sont aujourd'hui disponibles avec des niveaux de résolution et de précision variés, tout comme leurs vitesses de balayage. Ce projet a été conduit à l'aide de systèmes quadripolaires, peu résolutifs, mais présentant de nombreux avantages, notamment pour l'analyse ciblée de nombreux composés.

#### D. L'analyseur quadripolaire

Le quadripôle (Q) est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique. Les électrodes opposées sont reliées entre elles et soumises au même potentiel alors que les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels de même valeur, mais opposés en charge (négatif, positif) de sorte que l'écart de potentiel soit égal à  $\phi_0$  (**Figure 9**). Les ions provenant de la source sont soumis à une tension continue et à une tension alternative, toutes deux appliquées entre ces quatre électrodes. Le trajet des ions dans le quadripôle est oscillant. Si l'amplitude des oscillations est trop grande, les ions ne seront pas détectés. Les tensions sont donc réglées de telle sorte que seul un ion de rapport  $m/z$  choisi puisse atteindre le détecteur (trajectoire stable). Bien que peu résolutif, le quadripôle a pour principal avantage de pouvoir être utilisé comme un filtre à ions. En outre, sa vitesse de balayage et son adaptabilité à différentes interfaces le rendent excellent pour les couplages aux systèmes de chromatographies liquides et très efficace pour la spectrométrie de masse en tandem<sup>101</sup>. Sa gamme dynamique, c'est-à-dire la linéarité entre la concentration en molécules et la réponse du détecteur, est large (d'ordre du nM) et le rend pleinement adapté aux analyses quantitatives ciblées.



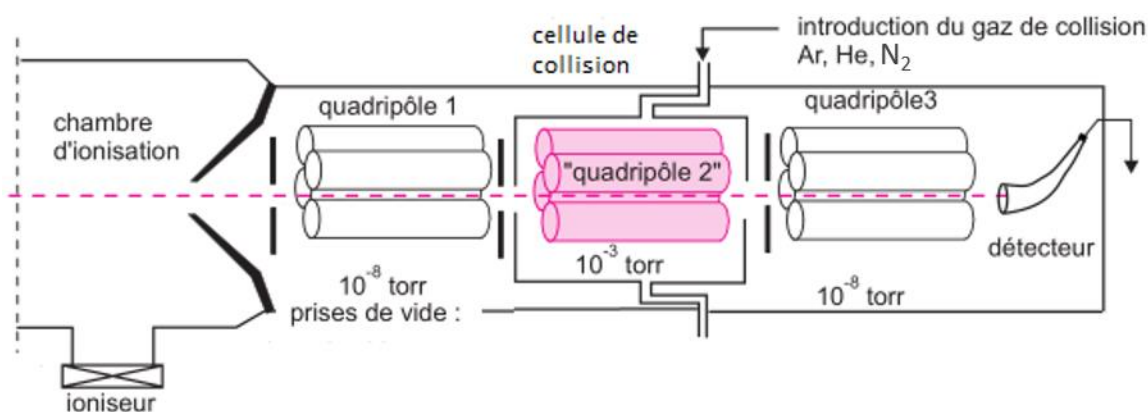
**Figure 9 : Principe du quadripôle**<sup>102</sup>. La source d'ions correspondant à l'ESI forme les ions désolvatés qui vont être soumis à des tensions continues et alternatives entre ces quatre électrodes. Seule l'ion en résonance (c'est-à-dire, l'ion oscillant entre le réglage des tensions des électrodes spécifiques à un  $m/z$ ) est guidé entre les électrodes et est envoyé vers le détecteur.



Les ions générés par ESI étant peu sujets à fragmentation dans la source d'ionisation, il est possible de coupler l'analyseur quadripôle afin de réaliser de la spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS. Ce type d'assemblage est très utile pour gagner en sélectivité et par conséquent en sensibilité.

### E. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

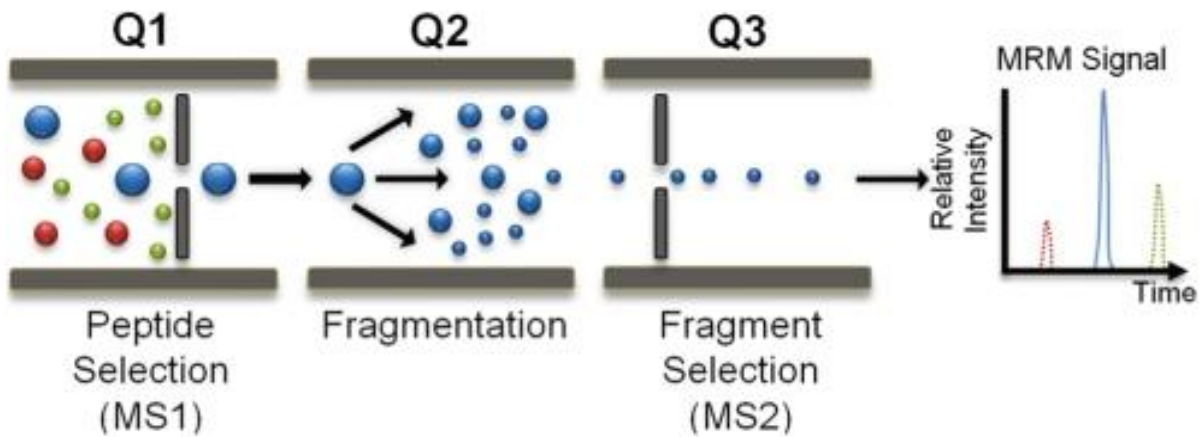
La spectrométrie de masse en tandem consiste à combiner plusieurs analyseurs de masse. Un ion précurseur, ayant un certain rapport  $m/z$ , est sélectionné dans le premier Q. Cet ion est ensuite dirigé vers une cellule de collision où, sous l'influence d'un gaz inerte (Argon, Helium), il voit son énergie interne augmentée par collision jusqu'à sa dissociation. Un second analyseur mesure les rapports  $m/z$  des fragments générés (**Figure 10**). Le système utilisé durant ce projet est le triple quadripôle.



**Figure 10 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem avec un système triple quadripôle<sup>103</sup>.** La chambre d'ionisation forme les ions chargés qui prennent la direction du premier filtre Q1, ces ions entrent ensuite dans une cellule de collision Q2 où le gaz de collision intervient puis les ions fragments sont dirigés vers Q3 où le second filtre intervient selon leurs  $m/z$  spécifiques de chaque ions.

Le triple quadripôle (QqQ) est un système qui comporte deux filtres quadripolaires séparés par une cellule de collision. Le QqQ n'est réellement efficace que si des filtres de sélection des ions précurseurs ou fragments sont appliqués comme c'est le cas en mode « *Single Reaction Monitoring* » ou SRM. Ce mode consiste à sélectionner un ion précurseur de rapport  $m/z$  par le premier analyseur (Q1) puis de le fragmenter dans la cellule de collision (Q2) grâce au gaz de collision qui va augmenter les énergies internes des ions sélectionnés dans le Q1 jusqu'à leur dissociation et former des ions fragments. Ces ions fragments seront ensuite filtrés par le Q3, qui

pourra les sélectionner selon leurs  $m/z$  spécifiques. Ce mode présente une double sélectivité, au niveau de l'ion précurseur et de l'ion produit. En outre les deux analyseurs étant fixés à des tensions constantes, la sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage, faisant de la SRM un mode de choix pour la quantification (**Figure 11**).



**Figure 11 : Représentation schématique d'une sélection en mode SRM. Triple quadripôle en mode SRM.**

### **III. OBJECTIF DE L'ÉTUDE**

Mes travaux de recherche s'inscrivent dans la découverte, la validation et l'évaluation de nouveaux biomarqueurs d'intérêt clinique pour la prévision et/ou la stratification du risque CV chez des patients à haut risque. Le projet de recherche proposé s'inscrit pleinement dans ce contexte, en particulier pour l'évaluation de biomarqueurs déjà identifiés (TMAO et ADMA) et récemment révélés comme particulièrement intéressants dans ces pathologies.

La première phase de mon projet de recherche a donc été la mise en place des méthodes d'analyse par LC-MS/MS pour le dosage de ces composés d'intérêt ainsi que de leurs métabolites associés.

Après validation, ces méthodes analytiques ont été évaluées dans des petites cohortes de patients ( $n < 150$ ) présentant des phénotypes extrêmes (patients atteints de CKD sévères ou d'obésité morbide) afin d'évaluer la modulation des marqueurs sélectionnés dans des cas physiopathologiques à large spectre et de mieux comprendre les interconnexions métaboliques entre les molécules cibles et leurs métabolites associés.

Enfin, la dernière phase de mon projet s'est inscrite dans l'évaluation du pouvoir pronostique de ces marqueurs sur la prévision et/ou la stratification du risque CV. Pour cette étape, les marqueurs ciblés ont été quantifiés dans une cohorte de 1468 patients atteints d'un DT2 (SURDIAGENE) et suivis prospectivement sur 7 ans. Durant le suivi, 403 patients ont présenté un évènement CV majeur et 538 sont décédés (toutes causes confondues). Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées sur les échantillons plasmatiques de ces patients obtenus lors de leur inclusion à l'étude.

## IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### IV.1 Les patients

Dans un premier temps, les dosages des différents marqueurs potentiels de maladies cardiovasculaires ont été dosés dans 2 études préliminaires de patients atteints d'insuffisance rénale et d'obésité morbide. Puis dans un second temps, ces marqueurs potentiels de MCVs ont été dosés au sein d'une cohorte de patients DT2 suivis prospectivement sur 7 ans et ayant présenté ou non des MACEs.

#### IV.1.1 Patients atteints de maladies rénales chroniques (CKD)

Quatre-vingt-dix-neuf (99) patients atteints de CKD (stades 1 à 5)<sup>37</sup> et 18 patients non atteints (contrôles) ont été recrutés sous consentement éclairé (formulaire de consentement) entre octobre 2012 et décembre 2016 au sein du département de néphrologie et d'exploration de la fonction rénale de Lyon. Cette étude a été réalisée sur des patients hémodialysés ou CKD recrutés après mesure de leur GFR en excluant les patients ayant subi une greffe rénale. Les différents dosages ont été réalisés à partir de plasmas et les principales caractéristiques de ces patients sont reportées dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des 99 patients CKD et des 18 patients contrôles.** Moyenne  $\pm$  écart-type avec les tests statistiques de « Kruskal-Wallis » (non paramétrique) ou « one-way ANOVA » (paramétriques) après vérification de la normalité des données (test d'Agostino-Pearson).

	Contrôle	CKD 1-2	CKD 3	CKD 4-5	<i>p</i> value
<i>n</i>	18	53	31	15	-
Sexe H/F	13 / 5	28 / 25	9 / 22	12 / 3	-
Age (année)	41 $\pm$ 9	45 $\pm$ 16	57 $\pm$ 20	53 $\pm$ 21	0,0055
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24 $\pm$ 3	24 $\pm$ 4	24 $\pm$ 5	27 $\pm$ 7	0,5164
mGFR (mL/min)	100 $\pm$ 8	74 $\pm$ 9	46 $\pm$ 9	19 $\pm$ 5	< 0,0001
CT (mg/dL)	192 $\pm$ 50	194 $\pm$ 34	188 $\pm$ 51	151 $\pm$ 30	0,0068
TG (mg/dL)	83 $\pm$ 37	96 $\pm$ 36	124 $\pm$ 58	128 $\pm$ 54	0,0009
HDL-C (mg/dL)	43 $\pm$ 13	48 $\pm$ 13	48 $\pm$ 15	41 $\pm$ 16	0,0737
LDL-C (mg/dL)	133 $\pm$ 46	127 $\pm$ 32	115 $\pm$ 41	86 $\pm$ 27	0,0008

N : nombre de sujets ; IMC : indice de masse corporelle ; mGFR : taux de filtration glomérulaire mesuré ; CT : cholestérol total ; TG : triglycérides ; HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de basse densité.

Les paramètres cliniques des patients sont significativement modulés en fonction de la gravité des CKD, le mGFR diminuant significativement en fonction du stade de la pathologie. Le cholestérol total ainsi que le LDL cholestérol sont également diminués significativement pour les patients CKD de stade 4-5 alors que les triglycérides sont significativement augmentés.

#### IV.1.2 Patients atteints d'obésité morbide

Trente et un (31) patients atteints d'obésité morbide ont été recrutés sous consentement éclairé (formulaire de consentement) pour cette étude. Les prélèvements sériques ont été obtenus par le centre d'investigation clinique de Marseille avant que ces patients ne subissent une opération de chirurgie bariatrique, puis 6 et 12 mois après l'intervention. Les principales caractéristiques de ces patients sont données dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des 31 patients atteints d'obésité morbide.** Les patients sont classés avant et après chirurgie bariatrique suivis sur 14 mois (moyenne  $\pm$  écart-type). Tests statistiques de « Kruskal-Wallis » (non paramétrique) ou « one-way ANOVA » (paramétriques) après vérification de la normalité des données (test d'Agostino-Pearson).

	Avant chirurgie		Après Chirurgie		p value
	Base	6 Mois	12 Mois		
n	31	31	31		-
Sexe H/F	9 / 22	9 / 22	9 / 22		-
Sleeve / RYGB	14 / 17	14 / 17	14 / 17		-
Age (année)	41 $\pm$ 8	41 $\pm$ 8	41 $\pm$ 8		1
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	45 $\pm$ 6	34 $\pm$ 5	32 $\pm$ 5		< 0,0001
CT (mg/dL)	189 $\pm$ 31	170 $\pm$ 30	167 $\pm$ 30		0,0001
TG (mg/dL)	142 $\pm$ 107	88 $\pm$ 27	71 $\pm$ 22		< 0,0001
HDL-C (mg/dL)	43 $\pm$ 12	47 $\pm$ 10	54 $\pm$ 10		< 0,0001
LDL-C (mg/dL)	120 $\pm$ 21	102 $\pm$ 25	97 $\pm$ 24		0,0001
ASAT ( $\mu$ Kat/L)	23 $\pm$ 11	17 $\pm$ 6	17 $\pm$ 6		0,0125
ALAT ( $\mu$ Kat/L)	33 $\pm$ 25	17 $\pm$ 13	15 $\pm$ 7		0,0008
HOMA-IR (%)	5,4 $\pm$ 4,3	1,5 $\pm$ 1,2	1,4 $\pm$ 0,85		< 0,0001

N : nombre de sujets ; RYGB : Roux-en-Y Gastric Bypass ; IMC : indice de masse corporelle ; CT : cholestérol total ; TG : triglycérides ; HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de basse densité ; ASAT : aspartate aminotransférase ; ALAT : alanine aminotransférase ; HOMA-IR : Indice de résistance à l'insuline, *homeostasis model assessment of insulin resistance* en  $\mu$ kat/L : unité de mesure catalytique du système international (<https://www.bipm.org>).

Les chirurgies bariatriques diminuent significativement l'IMC chez les patients dès 6 mois après l'intervention, ainsi que les principaux paramètres cliniques associés tels que le cholestérol total, les triglycérides, le HDL cholestérol, le LDL cholestérol, les transaminases (ASAT et ALAT) et l'indice de résistance à l'insuline (HOMA-IR).

Les deux types de chirurgie n'ont pas révélé d'effets significativement différents à part pour le cholestérol total et celui contenu dans les LDL, qui sont réduits de façon plus importante après un by-pass (RYGB) qu'après une sleeve (-20% vs -15%, respectivement,  $p = 0,0019$  pour le cholestérol et  $p = 0,0007$  pour le LDL cholestérol). Les transaminases (ALAT et ASAT) ont également été diminuées de façon plus importante après by-pass mais uniquement 6 mois après intervention. Il ne s'agit donc pas d'un marqueur de différence puissant entre ces deux chirurgies.

#### **IV.1.3 Patients diabétiques (SURDIAGENE)**

La cohorte SURDIAGENE a été constituée pour le suivi prospectif de 1468 patients DT2. Les patients ont été régulièrement examinés au département d'endocrinologie de l'hôpital universitaire de Poitiers entre 2002 et 2012<sup>104</sup> afin de déterminer les polymorphismes génétiques de la fonction rénale de façon longitudinale sur 7 ans. Quatre-cent trois (403) patients ont présenté un MACE et 538 sont décédés durant le suivi. Les principaux critères d'exclusion étaient la résidence hors de la région de Poitiers et la mise en évidence d'une insuffisance rénale non diabétique. Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique local et un consentement éclairé écrit a été obtenu de tous les participants.

Les données cliniques ont été obtenues à l'inclusion des patients à partir des dossiers médicaux sous forme de mesures morphométriques, d'enregistrements de la pression artérielle et d'électrocardiogrammes. Les antécédents d'infarctus du myocarde ou de maladie artérielle périphérique symptomatique ont été également inclus ainsi que les données biologiques. Les concentrations sériques d'hémoglobine glyquée (HbA1c) et de créatinine sérique ont été déterminées dans un laboratoire central en utilisant une méthode de chromatographie (analyseur ADAMS A1c HA-8160, Menarini, Florence, Italie) et une méthode colorimétrique sur un analyseur automatique (KONE Optima, Thermo Clinical LabSystems, Vantaa, Finlande), respectivement. L'eGFR a été calculé à l'aide de la formule traditionnellement utilisée<sup>105</sup>.

**Tableau 4 : Paramètres biologiques, morphométriques initiales et incidence cumulée des évènements cardiovasculaires de la cohorte SURDIAGENE<sup>106</sup>.**

Paramètres cliniques	Étude SURDIAGENE moyenne ± SD, *exceptions précisées
% Femmes (n)*	42 (620) *
% Hommes (n)*	58 (848) *
Ages (années)	65 ± 11
% Fumeur (n)*	100 ± 153*
SBP (mmHg)	132 ± 18
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	31,3 ± 6,3
ASAT (UI/L)	33,4 ± 157
ALAT (UI/L)	36,3 ± 146
Cholestérol total (mmol/L)	4,8 ± 1,2
HDL-C (mmol/L)	1,2 ± 0,4
LDL-C (mmol/L)	2,7 ± 1,0
TG (mmol/L)	1,91 ± 1,4
HbA1c, mmol/mol (>6%, % population)	62 ± 7,78*
UAE (mg/L) - Médiane (IQR)	25 (8,9-102,2) *
eGFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	76,25± 28,35
Antécédent IDM, % (n)	15,2 (224) *
Antécédent AVC, % (n)	5,6 (83) *
Premiers évènements majeurs de CV, âges de 1000 patients (années) <sup>A</sup>	35,4*
Tous les évènements CV, âges de 1000 patients (années) <sup>B</sup>	57,3*
IDM, âges de 1000 patients (années)	11,4*
Morts CV, âges de 1000 patients (années)	28,5*

SBP : pression artérielle systolique (*systolic blood pressure*) ; IMC : indice de masse corporelle ; ASAT: aspartate aminotransférase ; ALAT: alanine aminotransférase ; HDL-C: cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C: cholestérol des lipoprotéines de basse densité ; TG: triglycérides ; HbA1c : taux d'hémoglobine glyquée ; UAE: extraction d'albumine urinaire ; IQR: intervalle interquartile ; eGFR: débit de filtration glomérulaire estimé ; IDM: infarctus du myocarde ; CV: cardiovasculaire ; AVC: accident vasculaire cérébral.

<sup>A</sup> Incidence combinée des décès CV, des infarctus du myocarde, des AVC et d'insuffisances cardiaques ayant entraîné l'hospitalisation.

<sup>B</sup> Incidence combinée des infarctus du myocarde, des AVC, des insuffisances cardiaques entraînant une hospitalisation, d'angioplastie coronarienne / périphérique ou de pontage coronarien, de décès CV.

Au sein de cette cohorte, il y a également 638 patients DT2 non obèses, 375 DT2 obèses et 155 DT2 obèses morbides qui présentent au sein de chaque groupe des patients ayant présenté des évènements CVs majeurs ou non.

Ces patients peuvent également être classés par classe de CKDs comme décrit précédemment, le DT2 engendrant des insuffisances rénales. Au sein de SURDIAGENE, 1047 patients en insuffisance rénale de stade 1-2, 314 patients de stade 3 et 107 patients de stade 4-5 présentant chacun des évènements CVs majeurs ou non ont été détectés.

Ainsi la modulation de ces marqueurs potentiels de MCVs et l'évaluation du pouvoir pronostique de ces marqueurs sur la prévision et/ou la stratification du risque CV pourra être réalisée à partir de ces données.

## **IV.2 Préparation des échantillons**

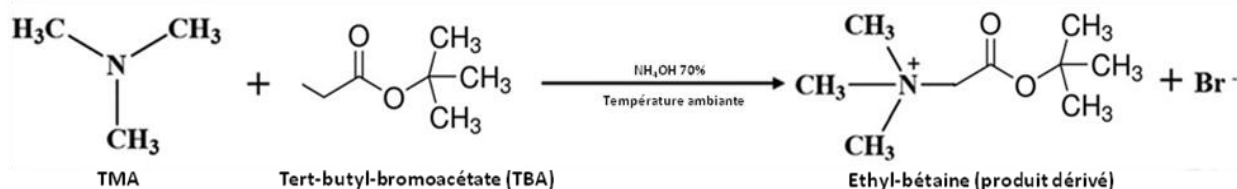
### **IV.2.1 TMAO et métabolites associés**

#### **A. Principe et dérivation de la TMA**

Le TMAO et ses métabolites associés (TMA, bétaine, choline, carnitine et créatinine) sont des molécules de bas poids moléculaire et polaires. Elles sont donc peu retenues en phase inverse et sont co-élués. Nous avons donc opté pour une colonne BEH-HILIC : technologie « *Ethylene Bridged Hybrid (BEH)* » correspondant à une silice hybride non fonctionnalisée conçue pour retenir et séparer les composés très polaires et pour être plus robuste que les phases classiques HILIC à base de grains de silice. La stabilité chimique de la particule BEH se traduit par une longue durée de vie des colonnes. Cette colonne permet de séparer les molécules en fonction de leur hydrosolubilité<sup>107</sup>.

La TMA étant volatile et de très petite taille, il est nécessaire d'augmenter sa taille pour pouvoir l'analyser et donc la rendre plus facilement détectable par le spectromètre de masse. Il faut donc ajouter une étape de dérivation chimique qui consiste à transformer la TMA en un produit dérivé de plus grande taille, l'éthyl-bétaine (**Figure 12**)<sup>108</sup>. Cette étape augmente ainsi la sensibilité de la méthode.





**Figure 12 : Réaction de dérivation de la TMA.** La molécule de TMA subit à pH basique et à température ambiante le greffage du tert-butyl-bromoacétate (TBA) sur son amine qui se charge positivement et ainsi forme une molécule d'éthyl-bétaine que l'on appelle le produit dérivé.

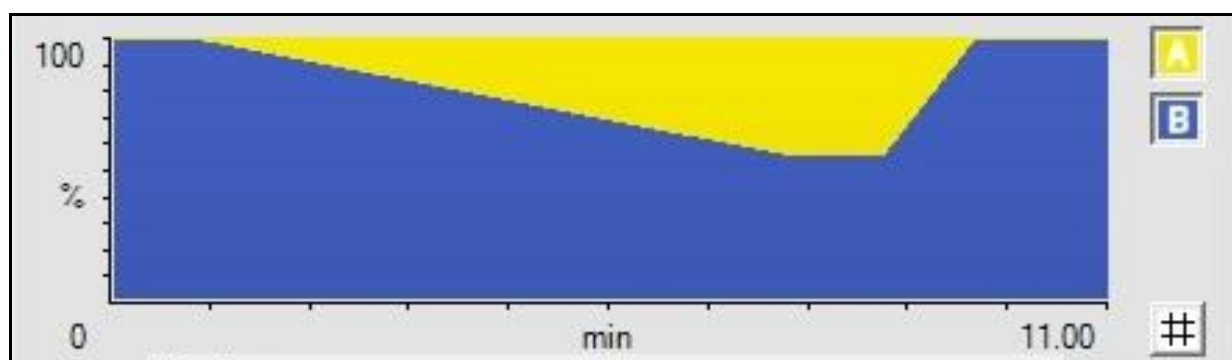
## B. Extraction et quantification

Une gamme étalon de 0,05 à 10  $\mu\text{mol/L}$  a été préparée à partir d'un pool de solutions standards dilué en série dans de l'acétonitrile. Pour chaque dosage, des standards internes (SI) ont été utilisés. Ces composés sont exogènes, ont des propriétés physico-chimiques similaires à celles des métabolites d'intérêt et sont distribués à une concentration fixe et connue à tous les échantillons biologiques ainsi qu'aux solutions calibrantes. Cette méthode permet de s'affranchir des interférences liées à l'appareil (effets matrice) ou de palier aux éventuelles erreurs expérimentales survenues lors de la préparation des échantillons.

Les dosages ont été réalisés dans le plasma/sérum (20  $\mu\text{L}$ ). Un mélange des SI ( $^2\text{H}_9$ -choline,  $^2\text{H}_9$ -carnitine,  $^{13}\text{C}_2$ -bétaine,  $^{13}\text{C}_3$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-TMA et  $^2\text{H}_9$ -TMAO) à 3  $\mu\text{mol/L}$  en acétonitrile a été ajouté (10  $\mu\text{L}$ ) à chaque échantillon biologique et solution calibrante. Les échantillons ont ensuite été traités avec 75  $\mu\text{L}$  de solution de dérivant (ter-butyl-bromoacétate, TBA) à 50 mmol/L dans l'acétonitrile et 10  $\mu\text{L}$  de solution d'hydroxyde d'ammonium à 70% en eau distillée. Les échantillons ont ensuite été incubés 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière, et la réaction a été stoppée par l'ajout de 50  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile contenant 1% d'acide formique. Les échantillons ont été agités et centrifugés 10 minutes à  $10\,000 \times g$  ( $10^\circ\text{C}$ ). Les surnageants ont ensuite été transférés dans des flacons pour l'analyse LC-MS/MS réalisée par le spectromètre de masse Xevo<sup>®</sup> TQD équipé d'une interface ESI et d'un dispositif Acquity H-Class<sup>®</sup> UPLC<sup>™</sup> (Waters Corporation).

Les échantillons ont été injectés (10  $\mu\text{L}$ ) sur une colonne BEH-HILIC (1,7  $\mu\text{m}$  ; 2,1  $\times$  100 mm, Waters Corporation) maintenue à  $45^\circ\text{C}$  et les composés ont été séparés *via* un gradient linéaire de phase mobile B (98 % acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique) dans la phase mobile A (10 mmol/L d'ammonium acétate contenant 0,1 % d'acide formique) à un débit de 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Le temps d'analyse par échantillon était de 11 minutes. La programmation du

gradient chromatographique utilisé est détaillée en **Figure 13**. La phase mobile A est ici la phase éluante car il s'agit d'un solvant polaire pouvant entrer en compétition avec la phase stationnaire de la colonne d'interaction hydrophile. Les conditions initiales en phase mobile A sont de 1% stabilisées pendant 1 minute avant d'être augmentées linéairement de 1% à 45% pendant 6,5 min., la phase mobile A est ensuite maintenue à 45% pendant 0,5 min. avant de revenir à l'état initial en 1,5 min. Pour finir, la phase mobile A est stabilisée à 1% pendant 1,5 min. avant l'injection suivante.



**Figure 13 : Représentation schématique du gradient chromatographique utilisé pour l'analyse du TMAO et des métabolites associés sur colonne HILIC.** La phase mobile A est ici représentée en jaune et la phase mobile B en bleu.

### C. Paramètres LC-MS

Les composés ciblés ont ensuite été analysés par le spectromètre de masse opérant en mode ESI+ (tension de capillaire à 1,5 kV ; débit et température du gaz de désolvatation (N<sub>2</sub>) à 650 L/h et 350°C ; température de la source à 150°C). Les paramètres SRM utilisés pour la détection MS/MS sont indiqués dans le **Tableau 5**.

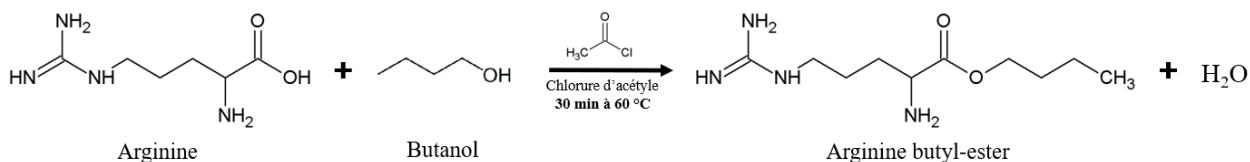
**Tableau 5 : Paramètres SRM utilisés pour l'analyse du TMAO et des métabolites associés.**

Composés	SRM théorique (m/z)	SRM mesuré (m/z)	Tension de Cône (V)	Energie de collision (eV)
TMAO	76,1 → 59,1	75,9 → 58,9	20	11
<sup>2</sup> H <sub>9</sub> -TMAO	85,1 → 68,1	85,0 → 68,0	20	11
TMA-dérivée	174,1 → 118,1	174,1 → 118,0	30	15
[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> , <sup>15</sup> N]-TMA-dérivée	178,1 → 122,1	178,1 → 122,0	30	15
Bétaïne	118,1 → 58,1	118,1 → 58,1	40	22
<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -bétaïne	120,1 → 58,1	120,1 → 58,1	40	22
Choline	104,1 → 60,1	104,1 → 60,1	40	15
<sup>2</sup> H <sub>9</sub> -choline	113,1 → 69,1	113,2 → 69,1	40	15
Carnitine	162,2 → 103,2	162,1 → 103,0	25	14
<sup>2</sup> H <sub>9</sub> -carnitine	171,2 → 69,2	171,1 → 69,1	25	14

#### IV.2.2 L'ADMA et ses métabolites associés

##### A. Principe et dérivation des acides aminés

Le dosage des arginines méthylées regroupe la quantification de plusieurs acides aminés qui entrent dans le métabolisme de l'arginine (**Figure 3**). Les composés étant proches les uns des autres par leurs masses moléculaires et leurs propriétés physico-chimiques, il est nécessaire de les dériver pour favoriser leur rétention sur la phase stationnaire, une phase inverse BEH-C<sub>18</sub>. Il s'agit d'une colonne avec une phase stationnaire BEH sur laquelle des chaînes carbonées de 18 carbones (-C<sub>18</sub>) ont été greffées. La dérivation des composés implique le greffage d'un groupement apolaire sur la fonction acide des composés, générant une perte d'eau, afin de former des esters de butanol (**Figure 14**). La technologie HILIC n'a pas été utilisée ici car elle ne permettait pas de séparer de façon satisfaisante l'ADMA de son isomère, la SDMA.

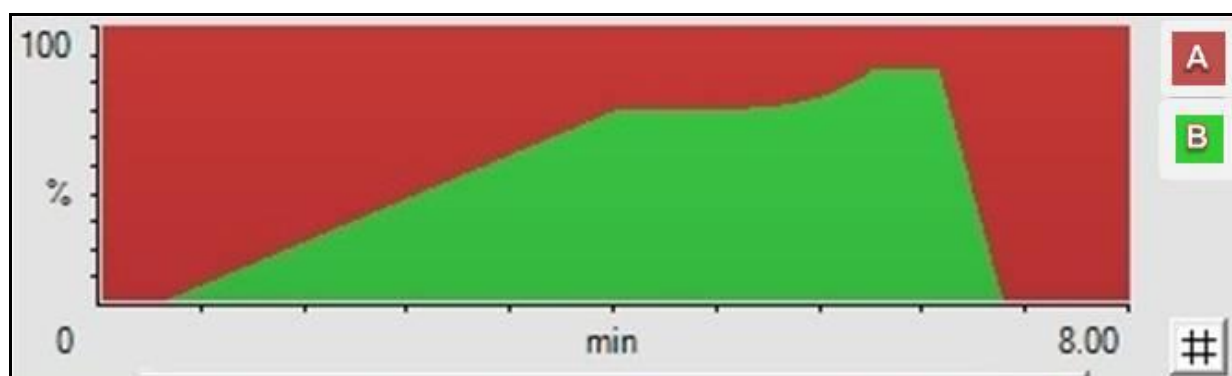


**Figure 14 : Réaction de dérivation des arginines méthylées.** Exemple de l'arginine, celle-ci subit en milieu acide et à 60°C une estérification au butanol afin de former une molécule plus lourde, l'arginine butyle-ester.

## B. Extraction et quantification

Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'un pool de solutions standards dilué en série dans de l'eau distillée afin d'obtenir 7 solutions calibrantes de 0,02 à 2  $\mu\text{mol/L}$  pour la NMMA et la SDMA, de 0,5 à 50  $\mu\text{mol/L}$  pour la citrulline et de 5 à 500  $\mu\text{mol/L}$  pour l'arginine. Des SI enrichis en isotopes stables ont également été utilisés pour ce dosage. Les dosages ont été réalisés dans le plasma (20  $\mu\text{L}$ ) et dans l'urine non diluée (20  $\mu\text{L}$ ). Une solution de SI (50  $\mu\text{L}$  à 125  $\mu\text{mol/L}$  de  $^{13}\text{C}$ -arginine, 25  $\mu\text{mol/L}$  de  $^2\text{H}_7$ -citrulline et 2,5  $\mu\text{mol/L}$  de  $^2\text{H}_7$ -ADMA) a été ajoutée aux échantillons biologiques et aux solutions calibrantes. Les échantillons ont ensuite été extraits par 100  $\mu\text{L}$  de méthanol puis agités et centrifugés 10 minutes à  $10\,000 \times g$  ( $10^\circ\text{C}$ ). Les surnageants ont ensuite été transférés dans des flacons LC-MS, puis évaporés totalement sous flux d'azote à  $45^\circ\text{C}$  (environ 15 minutes). Après séchage, les échantillons secs ont été solubilisés par 100  $\mu\text{L}$  de butanol contenant 5 % de chlorure d'acétyle (préparation extemporanée). Les échantillons ont ensuite été incubés 30 minutes à  $60^\circ\text{C}$  puis remis à évaporer sous flux d'azote à  $45^\circ\text{C}$  (environ 25 minutes). Enfin, les résidus secs obtenus ont été repris par 100  $\mu\text{L}$  d'eau distillée contenant 0,1 % d'acide formique.

Les échantillons ont ensuite été injectés (10  $\mu\text{L}$ ) dans le système décrit précédemment, équipé d'une colonne BEH- $\text{C}_{18}$  (1,7  $\mu\text{m}$  ;  $2,1 \times 100$  mm, Waters Corporation) maintenue à  $45^\circ\text{C}$ . Les composés ont été séparés par un gradient linéaire de phase mobile A (100 % d'eau UHPLC contenant 0,1 % d'acide formique) dans la phase mobile B (100 % de méthanol contenant 0,1% d'acide formique) à un débit de 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Le temps d'analyse par échantillon a été fixé à 8 minutes. La programmation du gradient chromatographique utilisé est détaillée en **Figure 15**. La phase mobile B est ici la phase éluante, car il s'agit d'un solvant apolaire pouvant entrer en compétition avec la phase stationnaire de la colonne en phase inverse. Les conditions initiales en phase mobile B sont de 1% et stabilisées 0,5 minutes avant d'augmenter linéairement de 1% à 70% pendant 3,5 min., puis la phase mobile B est augmentée avec une pente plus douce proche d'un gradient isocratique (la phase mobile varie en très faible proportion) de 70% à 90% pendant 2,0 min puis maintenue à 90% pendant 0,5 min avant de revenir à l'état initial en 0,5 min. La phase mobile B est enfin stabilisée à 1% pendant 1,0 min avant l'injection suivante.



**Figure 15 : Représentation schématique du gradient chromatographique utilisé pour l'analyse de l'ADMA et des métabolites associés sur colonne BEH-C18. La phase mobile A est ici représentée en rouge et la phase mobile B en vert.**

### C. Paramètres LC-MS

Les composés ciblés ont ensuite été détectés par le spectromètre de masse opérant en mode ESI+ (tension capillaire à 3,0 kV ; débit et température du gaz de désolvatation (N<sub>2</sub>) à 650 L/h et 350°C ; température de la source à 120°C). Les paramètres SRM utilisés pour la détection MS/MS sont indiqués dans le **Tableau 6**.

**Tableau 6 : Paramètres SRM utilisés pour l'analyse de l'ADMA et des métabolites associés.**

Composés	SRM théorique (m/z)	SRM mesuré (m/z)	Voltage cône (V)	Energie collision (eV)
Arginine	231,2 → 69,9	231,1 → 69,9	30	20
<sup>13</sup> C-Arginine	232,2 → 69,9	232,1 → 69,9	30	20
NMMA	245,2 → 69,9	245,1 → 69,9	30	20
ADMA	259,2 → 214,1	259,1 → 214,1	30	20
SDMA	259,2 → 228,1	259,1 → 228,1	30	20
<sup>2</sup> H <sub>7</sub> -ADMA	266,2 → 221,1	266,2 → 221,1	30	20
Citrulline	232,2 → 112,9	232,1 → 112,9	30	20
<sup>2</sup> H <sub>7</sub> -Citrulline	239,2 → 119,9	239,1 → 119,9	30	20

## IV.2.3 Analyses des données

### A. Intégration des résultats

Les rapports d'aire de pics chromatographiques entre les composés ciblés et leurs SI respectifs ont constitué les réponses du détecteur. L'intégration des pics chromatographiques a été exécutée par les logiciels MassLynx™ et TargetLynx™ (version 4.1, Waters Corporation). Les solutions standards, dont les concentrations en métabolites sont connues, ont permis de tracer des droites d'étalonnage, [Réponse = f(concentration théorique)]. La linéarité, exprimée par le R<sup>2</sup> moyen, a été supérieure à 0,995 pour tous les composés analysés (régression linéaire, pondération 1/x, origine exclue).

### B. Analyses et statistiques

Les représentations graphiques et les tests statistiques ont été réalisés par le logiciel GraphPad Prism (version 6.0, GraphPad Software Inc, La Jolla, Californie, Etat-Unis). Les résultats ont été exprimés en moyenne ± SEM (écart standard à la moyenne), en moyenne ± SD (déviation standard), ou en médiane et interquartiles.

La distribution normale ou anormale des données a été évaluée par le test d'Agostino-Pearson. Les tests statistiques utilisés pour l'analyse des données sont décrits dans le **Tableau 7**. Les données ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ , la significativité des données est représentée sur les graphiques par des étoiles, « \* » correspondant à une valeur  $p : 0,05 < p > 0,01$ , « \*\* » correspondant à  $0,01 < p > 0,001$ , « \*\*\* » correspondant à  $p < 0,001$ .

**Tableau 7 : Les différents tests statistiques réalisés durant le projet de recherche.**

Type de données / d'analyse	Distribution Normale	Distribution Anormale
Données quantitatives appariées, groupe à groupe	T-test	Wilcoxon
Données quantitatives non-appariées, groupe à groupe	T-test	Mann-Whitney
Multiparamétriques quantitatives appariées, plusieurs groupes	One Way ANOVA avec la correction Greenhouse Geisser	Friedman
Multiparamétriques quantitatives non-appariées	One Way ANOVA	Kruskal-Wallis
Corrélations simples ou multiples entre jeux de données quantitatives (1 ou plusieurs groupes)	Pearson	Spearman

Au sein des différentes cohortes de patients les tests statistiques les plus sollicités ont été les tests de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Friedman et les corrélations de Spearman, car la majorité des valeurs n'étaient pas distribuées normalement. La corrélation de Spearman consistait à trouver un coefficient de corrélation entre les rangs de ces valeurs. Elle a permis d'estimer à quel point deux variables pouvaient être modulées de façon similaire. S'il n'y a pas de données répétées, une corrélation de Spearman parfaite est de +1 dans le cas d'une corrélation positive, ou de -1 dans le cas d'une corrélation négative.

Dans le cas de la cohorte SURDIAGENE, les données étant conséquentes et les patients nombreux, l'analyse statistique a été réalisée dans un premier temps selon le **Tableau 7**. Les données ont été discrétisées mathématiquement et transformées en intervalles. Cette transformation est appelée "découpage en classes (ici par quartiles)". Les 1468 patients ont été classés en 4 groupes équitables et par ordre croissants des données. Le 1<sup>er</sup> quartile est la donnée qui sépare les 25% inférieurs des données (Q1), le 2<sup>e</sup> quartile est la donnée de la série qui sépare les 50% inférieurs des données (Q2), le 3<sup>e</sup> quartile est la donnée de la série qui sépare les 75% inférieurs des données (Q3) et le 4<sup>e</sup> quartile aussi appelé « la maximum » correspond à la donnée de la série qui sépare les 0% supérieurs des inférieurs des données (Q4). Une analyse plus fine a été diligentée auprès de biostatisticiens expérimentés. La durée de survenue du premier événement MACE (mortalité CV, infarctus du myocarde non mortel, AVC non mortel) est le critère principal utilisé pour ces analyses statistiques. Les variables continues et catégorielles sont analysées par un test de Mann-Whitney et de chi-2. Les variables sont normalisées et standardisées pour faciliter les comparaisons et stratifiées en quartiles comme définis précédemment. Une correction statistique est utilisée pour tenir compte des comparaisons multiples (correction de « Benjamini-Hockberg »). La sélection de variables dans le cadre de données à forte dimensionnalité et fortement inter-corrélées est traitée suivant un modèle statistique de régression à risques proportionnels (Cox) qui suit l'algorithme *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator* (LASSO). Ce modèle permet de former des courbes de Kaplan-Meier, indiquant la proportion de chaque groupe où le point final n'a pas été atteint. Ceci permet ainsi de définir le rapport de risque (*hazard ratio* : HR) entre deux classes différentes, ici définis en quartiles.

Le risque de MACE prend en compte toutes les espèces simultanément, et également les variables cliniques et anthropométriques classiques prédictives du risque vasculaire des patients DT2. Le paramètre optimal  $\lambda$  est choisi comme maximisant la vraisemblance partielle telle que

déterminée par une validation croisée (*10-fold cross-validation*). Pour tenir compte de la variance potentiellement importante issue de cette validation croisée, le processus est répété 1000 fois. Les intervalles de confiance (IC) pour la sélection LASSO des espèces sont calculés par régression de Cox non pénalisée conventionnelle. Les performances prédictives des espèces lipidiques sélectionnées *via* LASSO sont par la suite évaluées en calculant d'abord les performances du modèle de base puis en ajoutant des espèces à ce modèle de base et en calculant le « Harrel C », les index de reclassification (NRIs) et le changement de performance du modèle en utilisant l'amélioration intégrée de la discrimination (*Integrated discrimination improvement, IDI*) et l'IDI relatif en validation-croisée (200 répétitions)<sup>109</sup>. Les co-variables utilisées dans les analyses de l'essai sont là encore les variables cliniques et anthropométriques classiques prédictives du risque vasculaire de patients DT2. Il a été décidé d'utiliser un modèle prédictif issu de la littérature pour évaluer les MACEs. Plusieurs modèles sont disponibles et nous avons choisi l'estimateur de risque construit à partir des données issues de l'étude UKPDS, formellement regroupées dans le UKPDS OM2<sup>110</sup>, puisque nos études préliminaires ont montré la bonne adéquation entre le risque prédit par ce calculateur de risque et le risque observé effectivement sur nos données<sup>111</sup>. L'analyse est réalisée sur les logiciels R ou SAS par les cliniciens du CHU de Poitiers.



## V. RESULTATS

### V.1 Développements méthodologiques

D'après Kadar et ses collaborateurs<sup>112</sup>, les méthylamines peuvent être quantifiées par LC-MS/MS. Par ailleurs, Di Gangi et ses collaborateurs<sup>75</sup> ont développé une méthode d'analyse rapide et précise des arginines méthylées (ADMA, SDMA et NMMA) par LC-MS/MS. Nous avons donc adapté ces méthodes en partant des standards analytiques correspondant aux molécules d'intérêt. Pour chaque standard, les paramètres analytiques optimaux en MS ont été déterminés par introduction directe de l'échantillon sous forme liquide dans la source ESI, aussi appelés « infusion » de l'échantillon. Les paramètres de détection ont ainsi été optimisés pour chaque composé afin d'obtenir une détection sélective la plus sensible possible des molécules d'intérêt. La sensibilité de la masse est molécule dépendante, c'est pourquoi les paramètres analytiques sont importants à définir.

La validation partielle des différents dosages est basée sur la mesure de la précision du dosage. La précision est le degré de reproductibilité, indiquée en % de coefficient de variation (CV). Celle-ci est décrite comme étant la précision intra-journalière, intra-analyse (répétabilité de la précision lors d'une analyse unique) et inter-jours (trois analyses au moins). L'inter-analyse correspond à la reproductibilité qui indique la variation de la précision en fonction du temps et peut également inclure différents paramètres (personnel d'analyse, équipement et réactifs)<sup>113,114</sup>. La variation de la précision des échantillons ne doit pas être dépassée de 15% d'après les critères de validation de la « *Food and Drug Administration* » (FDA)<sup>114</sup>.

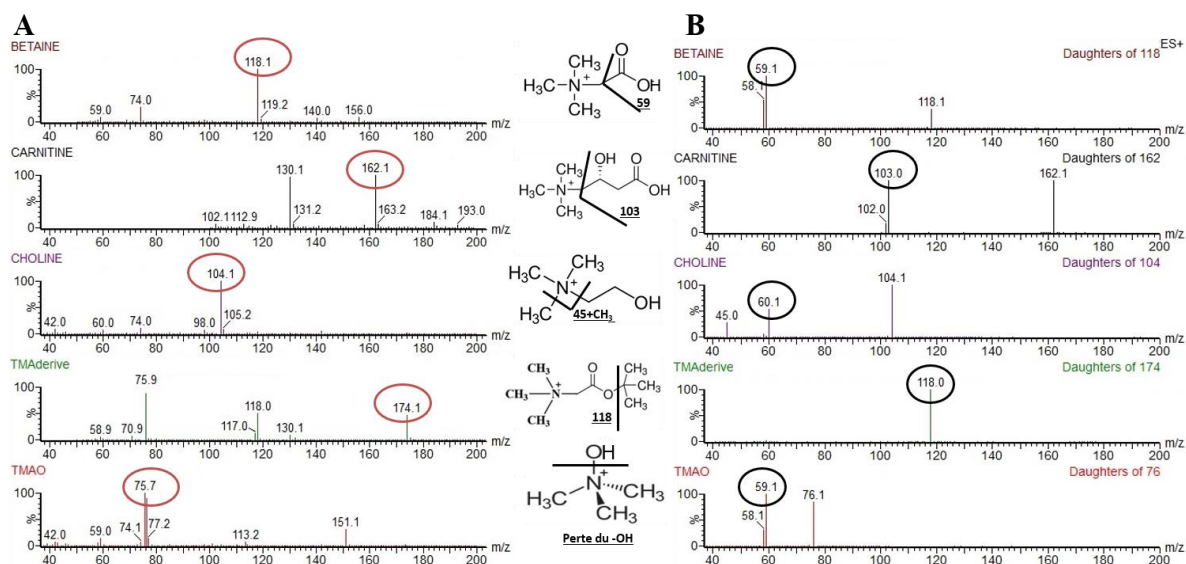
Les méthodes d'analyses ont été validées préalablement par Kadar et ses collaborateurs<sup>112</sup> et Di Gangi et ses collaborateurs<sup>75</sup> selon les critères standards de linéarité, de précision (répétabilité de mesures intra et inter-expérimentales), de justesse (méthode des ajouts dosés et conformités entre concentrations théoriques et expérimentales) et de stabilité. Par ailleurs, lors de l'analyse de la cohorte SURDIAGENE un échantillonnage représentatif et aléatoire (n= 80) a été redosé en double aveugle. Les CVs calculés entre les valeurs obtenues lors des deux analyses étaient inférieurs à 15%, quelle que soit la molécule ciblée. Ceci confirme à nouveau la répétabilité des méthodes mises en place (résultats non présentés ici).

## V.1.1 TMAO et métabolites associés

### A. Paramètres de détection

Le TMAO et les autres méthylamines ont été infusés dans la chambre d'ionisation avec une tension de capillaire réglée à 1,5 kV afin de former les premiers ions correspondant à chaque standard analytique, appelés « ions précurseurs » de  $m/z$ , par exemple :  $[M+H]^+$  un ion pseudomoléculaire qui peut être le précurseur choisi.

Pour chaque standard analytique, il a été défini le potentiel électrique du cône dans un premier temps afin de former les ions précurseurs avant leur entrée dans la cellule de collision où un second potentiel électrique défini est appliqué au gaz de collision afin de former les ions fragments (**Figure 16**) et ainsi définir les transitions SRM (**Tableau 5**). En A de la figure 16, sont représentés les spectres de masse obtenus après le premier filtre quadripolaire correspondant à l'ion  $[M+H]^+$  de chaque standard analytique, aussi appelé « ion précurseur ou ion parent ». En B, sont représentés les spectres de masse après application du gaz de collision sur l'ion précurseur de chaque molécule. Les ions formés à partir de l'ion parent correspondent aux ions fragments, aussi appelés « ions produits ou ions fils ». Les ions choisis n'étaient pas nécessairement les ions majoritaires du spectre de masse, mais correspondaient aux ions spécifiques de chaque molécule, c'est-à-dire à une fragmentation et à un état d'ionisation connus et théoriquement stables.

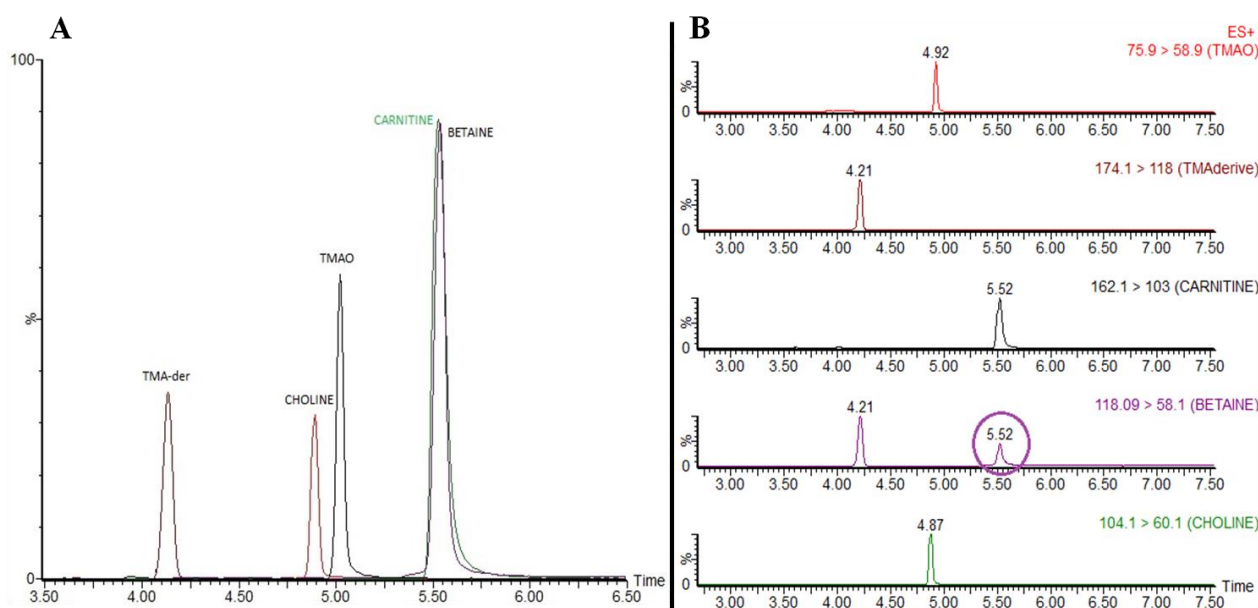


**Figure 16 : Spectres de masse acquis en mode SCAN (A) et en mode SCAN d'ions produits (B) du TMAO et méthylamines.** Les molécules sont de haut en bas : bétaine, carnitine, choline, TMA dérivé et TMAO, avec leurs énergies de collisions respectives de 22, 14, 15, 15 et 11 eV. Entre les deux représentations se trouvent les schémas de fragmentations à l'origine des ions fragments retenus pour les analyses.

## B. Séparation chromatographique

Après avoir déterminé les paramètres d'analyse du spectromètre de masse, les paramètres de séparation chromatographique des composés ont été optimisés sur la chaîne Acquity H-Class® UPLC™ d'après les articles de Kadar et ses collaborateurs<sup>112</sup> et de Si Mi et ses collaborateurs<sup>108</sup>. Dans un premier temps une solution contenant les standards analytiques a été injectée sur la colonne HILIC afin de déterminer le temps de rétention de chaque molécule et d'identifier les pics chromatographiques (**Figure 17**).

Sur la **Figure 17**, deux pics chromatographiques ont été observés pour la bétaine, car les ions spécifiques de la bétaine ( $m/z$  118,1 → 58,1) croisaient avec ceux de la TMA dérivée ( $m/z$  174,1 → 118,0). Cependant, les pics chromatographiques possédaient des temps de rétention ( $Tr$ ) différents ( $Tr = 4,21$  min pour la TMA et  $Tr = 5,52$  min pour la bétaine), ce qui a permis de les différencier aisément. Le chromatogramme a également montré que la carnitine ( $m/z$  162,1 → 103,0) avait le même  $Tr$  que la bétaine. Cependant, ces deux molécules présentaient des transitions SRM totalement différentes, ce qui a permis de les différencier sans ambiguïté.

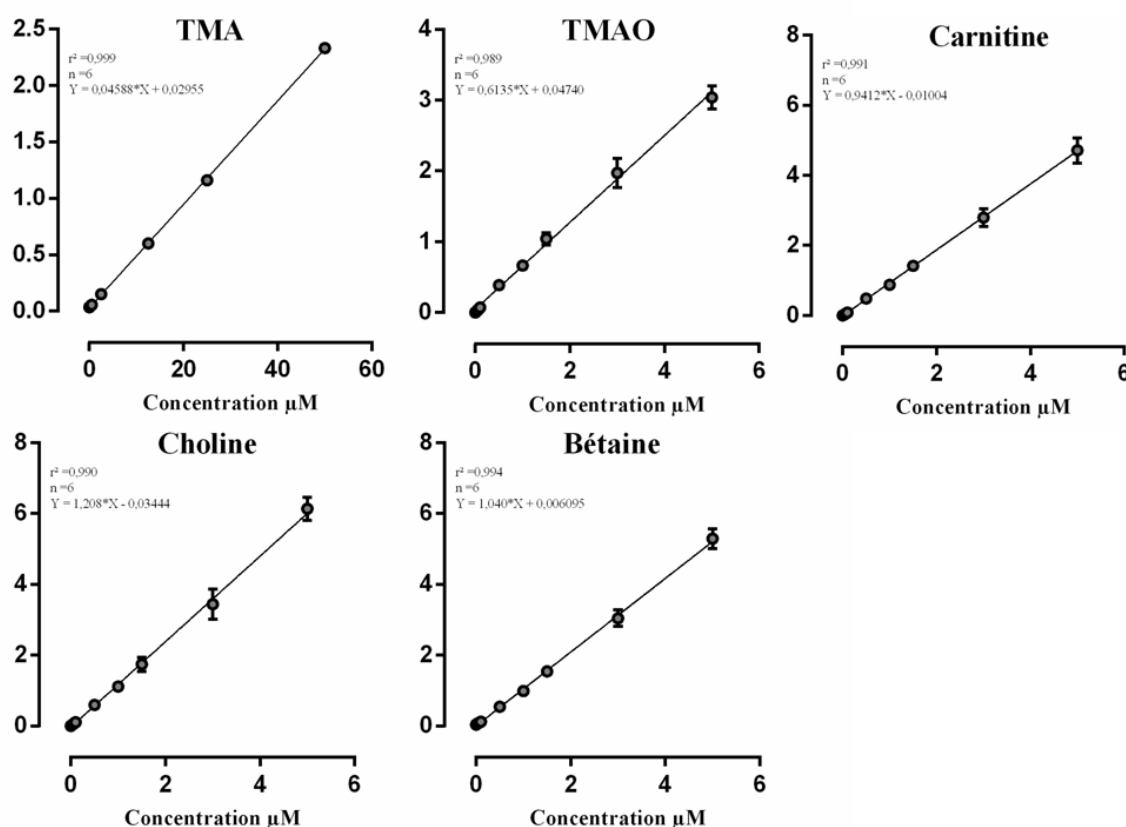


**Figure 17 : Profils chromatographiques de chaque standard analytique à partir d'une solution mixte injectée sur le système UHPLC. En A, pics chromatographiques du « total ion current, TIC ». En B, chaque molécule a été isolée par sa transition SRM définie précédemment, le pic spécifique de la bétaine est entouré d'un cercle violet.**

### C. Validation partielle du dosage des méthylamines plasmatiques

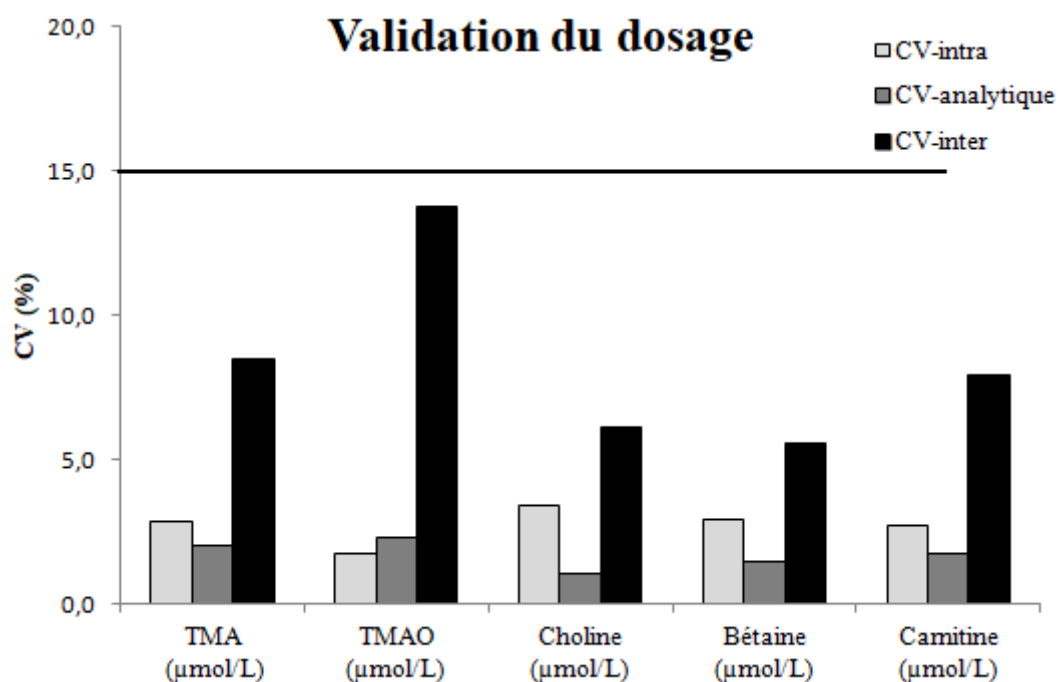
Une fois les paramètres analytiques définis, nous avons opté pour une validation partielle de la méthode selon notre environnement analytique, celle-ci ayant été validée préalablement par Kadar et ses collaborateurs<sup>112</sup>. La reproductibilité et la répétabilité du dosage ont été évaluées à travers trois expérimentations indépendantes à partir d'un pool de plasmas témoins issu de la sérothèque interne du laboratoire. Les analyses ont été effectuées sur 6 réplicas par expérimentation et la quantification a été réalisée à l'aide de deux gammes de calibration fraîchement réalisées et extraites à chaque dosage.

En **Figure 18** sont représentées les régressions linéaires des courbes de quantification de chaque composé d'intérêt. La méthode s'est avérée linéaire dans les limites de calibration définies par des  $R^2$  allant de 0.989 (TMAO) à 0.999 (TMA).



**Figure 18 : Linéarité du dosage du TMAO et de ses métabolites.** Trois expérimentations effectuées sur 3 jours différents avec 2 réplicas par dosage (n = 6). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD.

Les coefficients de variation (CV) ont ensuite été calculés sur les valeurs des 6 réplicas au sein d'une expérimentation ( $CV_{\text{intra}}$ ) ou entre les 18 réplicas ( $3 \times 6$ ) des 3 expérimentations ( $CV_{\text{inter}}$ ). La répétabilité analytique ( $CV_{\text{analytique}}$ ) a également été évaluée en injectant le même échantillon à 6 reprises. Comme illustré sur la **Figure 19**, la méthode développée s'est avérée précise et répétable avec des  $CV_{\text{intra}}$  et  $CV_{\text{analytique}} < 5\%$  pour l'ensemble des composés ciblés et des  $CV_{\text{inter}}$  compris entre 5% (Bétaïne) et 13% (TMAO).



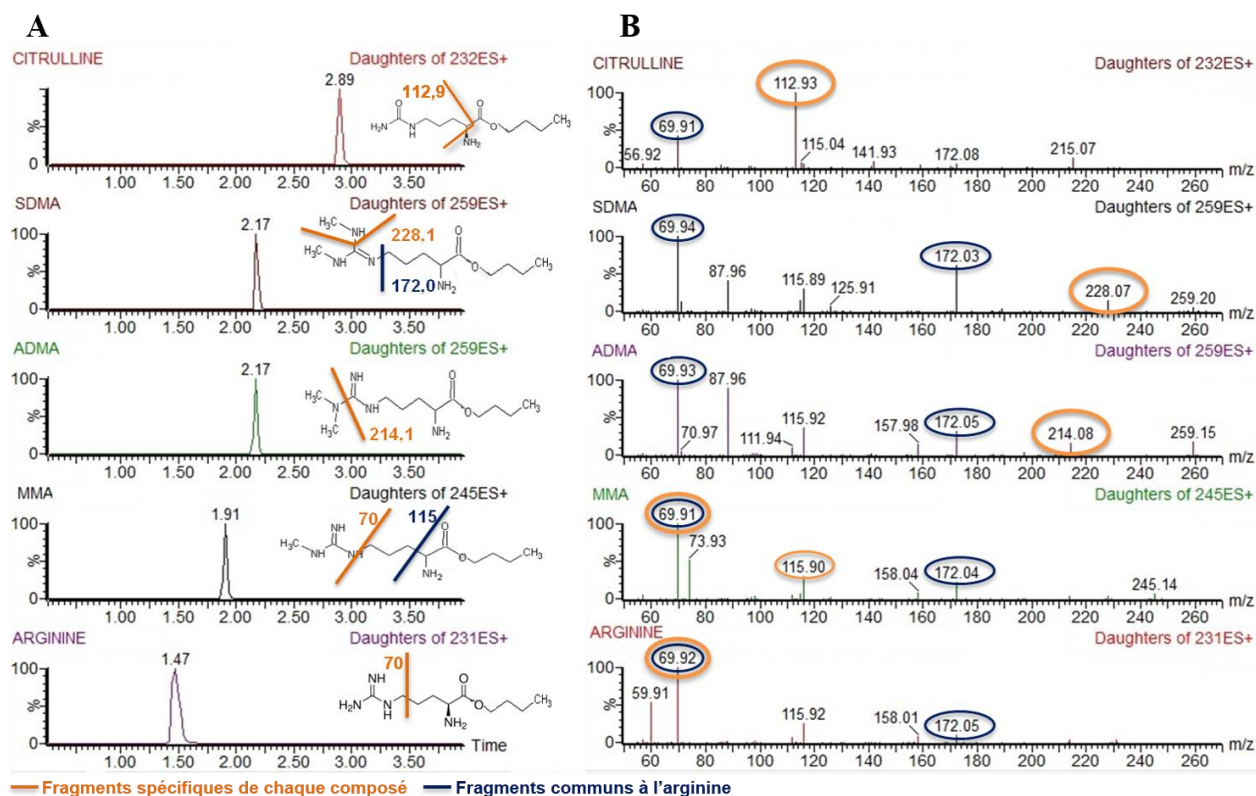
**Figure 19 : Répétabilité et reproductibilité du dosage des méthylamines.** La ligne noire représente le seuil supérieur d'acceptabilité des CVs (15%).

## V.1.2 ADMA et métabolites associés

### A. Optimisation des paramètres analytiques

Ces composés ayant subi une dérivation préalable, il était difficile de passer par l'infusion directe pour déterminer les transitions SRM (**Tableau 6**). C'est pourquoi les standards analytiques dérivés ont été injectés individuellement dans le système chromatographique, sur colonne BEH- $C_{18}$ , et ont subi la même procédure que pour les méthylamines au travers des filtres quadripolaires afin de déterminer les ions précurseurs et fragments de chaque standard analytique dérivé (**Figure 20**). Les tensions de cône et de collision permettant la meilleure détection ont été retenus pour les transitions SRM.

L'ADMA et les autres arginines méthylées ont ainsi été séparées sur colonne BEH-C<sub>18</sub> maintenue à 50 °C suivant un gradient linéaire de phase mobile A (100 % d'eau UHPLC contenant 0,1 % d'acide formique) dans la phase mobile B (100 % de méthanol contenant 0,1% d'acide formique) à un débit de 400 µL/min (**Figure 15**).

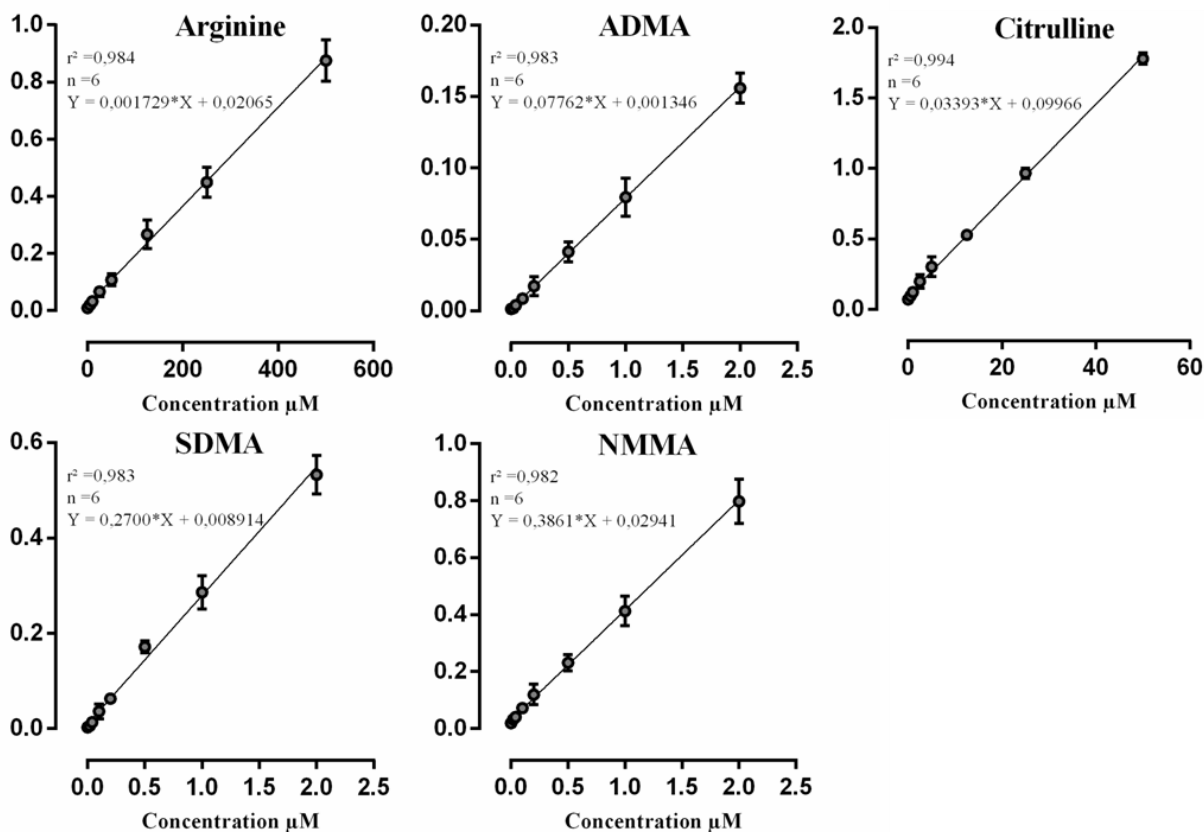


**Figure 20 : Chromatogrammes acquis en mode « daughter » Scan (A) et spectres MS/MS des ions produits des arginines méthylées dérivées (B).** Les molécules de haut en bas : la citrulline, la SDMA, l'ADMA, la MMA (MMA) et l'arginine donnant les ions fragments après application d'énergie de collision de 20 eV. Les ions fragments spécifiques de chaque composé sont représentés en orange, les fragments communs à l'arginine sont représentés en bleu. Entre les deux représentations des spectres de masse, se trouve les schémas de fragmentation possible pour chaque molécule.

## B. Validation partielle du dosage des arginines méthylées plasmatiques

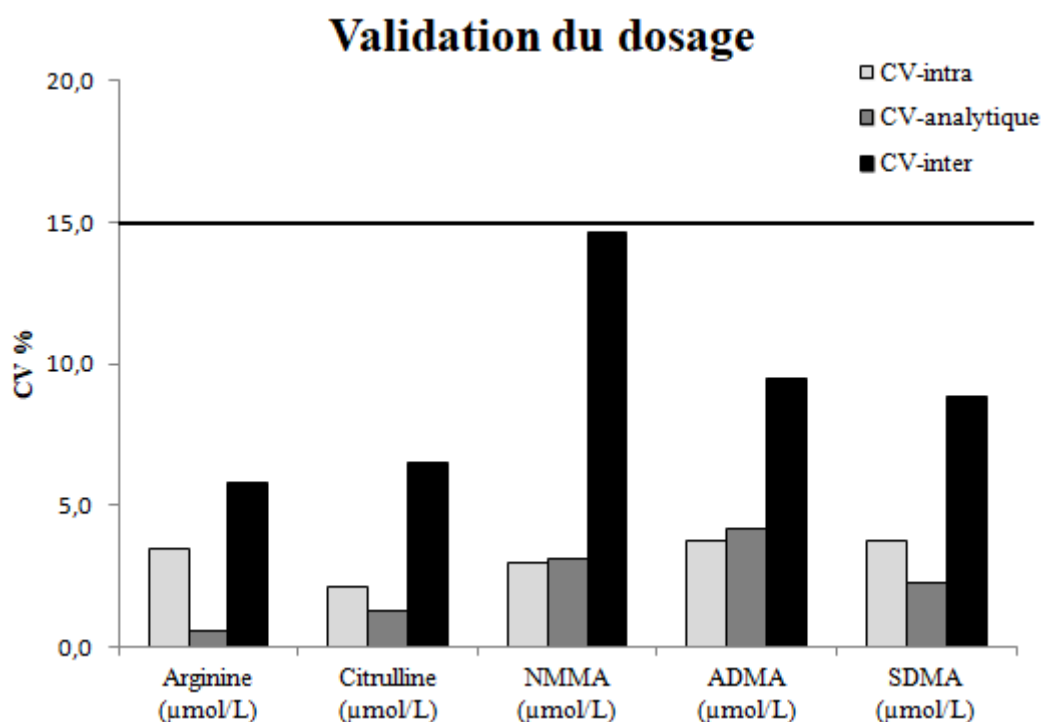
Comme précédemment, nous avons opté pour une validation partielle de la méthode de dosage de l'ADMA et de ses métabolites associés, celle-ci ayant été validée préalablement par Di Gangi et ses collaborateurs<sup>75</sup>. La reproductibilité et la répétabilité du dosage ont été évaluées à travers trois expérimentations indépendantes comme décrit précédemment.

En **Figure 21** sont représentées les régressions linéaires des courbes de quantification de chaque composé d'intérêt. La méthode s'est avérée linéaire dans les limites de calibration définies par des  $R^2$  allant de 0.982 (NMMA) à 0.994 (citrulline).



**Figure 21 : Linéarité du dosage de l'ADMA et de ses métabolites.** Trois expérimentations effectuées sur 3 jours différents avec 2 réplicas par dosage (n = 6). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD.

Comme illustré sur la **Figure 22**, la méthode développée s'est avérée précise et répétable avec des  $CV_{intra} < 5\%$  pour l'ensemble des composés ciblés et des  $CV_{inter}$  compris entre 6% (arginine) et 14,5% (ADMA).



**Figure 22 : Répétabilité et reproductibilité du dosage des méthylamines.** La ligne noire représente le seuil supérieur d'acceptabilité des CVs (15%).

### V.1.3 Stabilité et effets matrices

Suite à la validation, nous nous sommes aperçus que les échantillons n'étaient pas stables après 24h car la dérivation des métabolites se dégradent entraînant des profils chromatographiques altérés (doubles pics chromatographiques) et une perte de sensibilité du spectromètre de masse.

Nous avons également mis en évidence un effet matrice sur la quantification des métabolites du TMAO, notamment pour la choline induisant une surestimation de celle-ci dans le sérum. En effet, nous sommes aux alentours de 15 à 20 μM de choline dans le sérum tandis que dans le plasma nous sommes autour de 1 à 2 μM. Nous supposons que les protéines de coagulation ou cellules présentes dans le plasma et non présentes dans le sérum, doivent piéger certaines des molécules que l'on dose et/ou induisent une suppression ionique au niveau du détecteur de masse (c'est-à-dire que celui-ci est trop chargé en ions, car l'échantillon n'est pas assez pur). C'est pourquoi, il est important de connaître le type de matrice dans laquelle les molécules d'intérêt vont être analysées afin de pouvoir comparer des valeurs provenant de différentes cohortes, mais aussi dans le cas d'une même cohorte lorsque l'on doit comparer différents groupes entre eux.

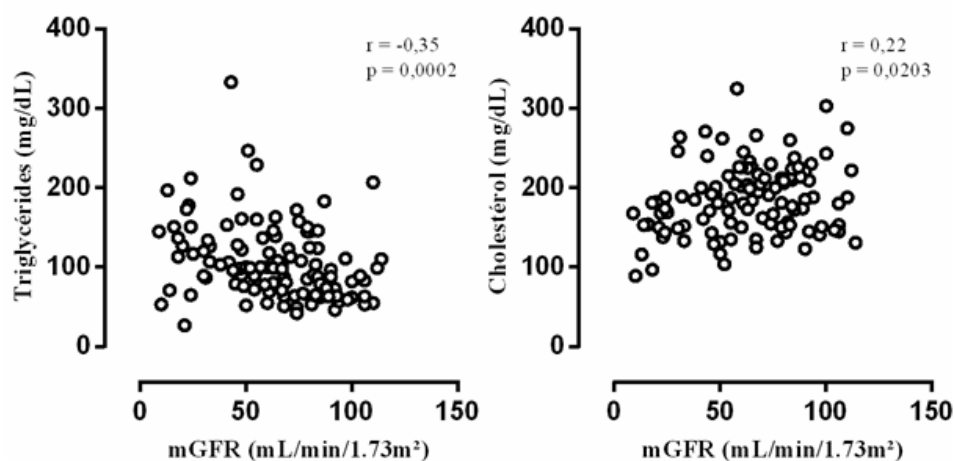


## V.2 Modulation des marqueurs en cas d'insuffisance rénale

Dans un premier temps, les patients ont été suivis par leurs paramètres cliniques montrant des différences significatives en fonction des classes de CKD (**Tableau 2**). En effet, les concentrations plasmatiques des triglycérides sont augmentés significativement entre les contrôles et les CKDs de type 3 à 5, alors que les concentrations en cholestérol total (CT) et de LDL cholestérol (LDL-C) sont diminuées significativement pour les patients CKD de type 4-5. En revanche, les concentrations en HDL cholestérol (HDL-C) sont constantes quel que soit le type de CKD.

Ces résultats ont montré que plus l'insuffisance rénale est importante, plus l'équilibre métabolique engendré par la maladie est altéré (diminution du cholestérol total, du LDL-C et augmentation des triglycérides).

Comme décrit dans la littérature, nous montrons bien que le taux de filtration glomérulaire mesuré (mGFR) permet de séparer les classes de CKD<sup>115</sup>. Les corrélations de Spearman obtenues entre le mGFR et les paramètres lipidiques des patients ont montré que le mGFR est inversement corrélé avec les triglycérides ( $r = -0,35$  ;  $p = 0,0002$ ) et positivement corrélé avec le cholestérol total ( $r = 0,22$  ;  $p = 0,0203$ ) (**Figure 23**).



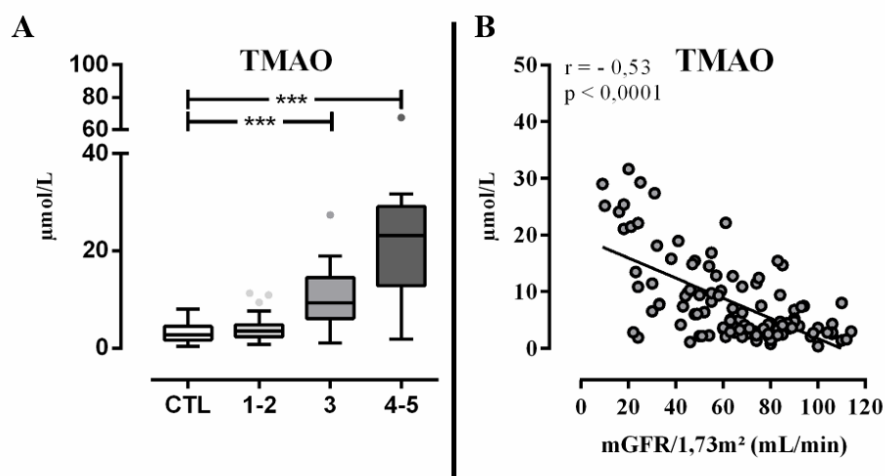
**Figure 23** : Corrélations de Spearman obtenues entre le mGFR et les paramètres lipidiques.

Au sein de ces patients insuffisants rénaux, 54 % des patients étaient non-obèses (IMC < 25 kg/m<sup>2</sup>), 35% étaient en surpoids (IMC compris entre 25 et 30 kg/m<sup>2</sup>), 10 % étaient obèses (IMC >

30 kg/m<sup>2</sup>) et 1 % étaient en état d'obésité morbide (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>). Les insuffisants rénaux de type 1-2 représentaient 54 % des patients, tandis que 31 % étaient de type 3 et 15 % de type 4-5.

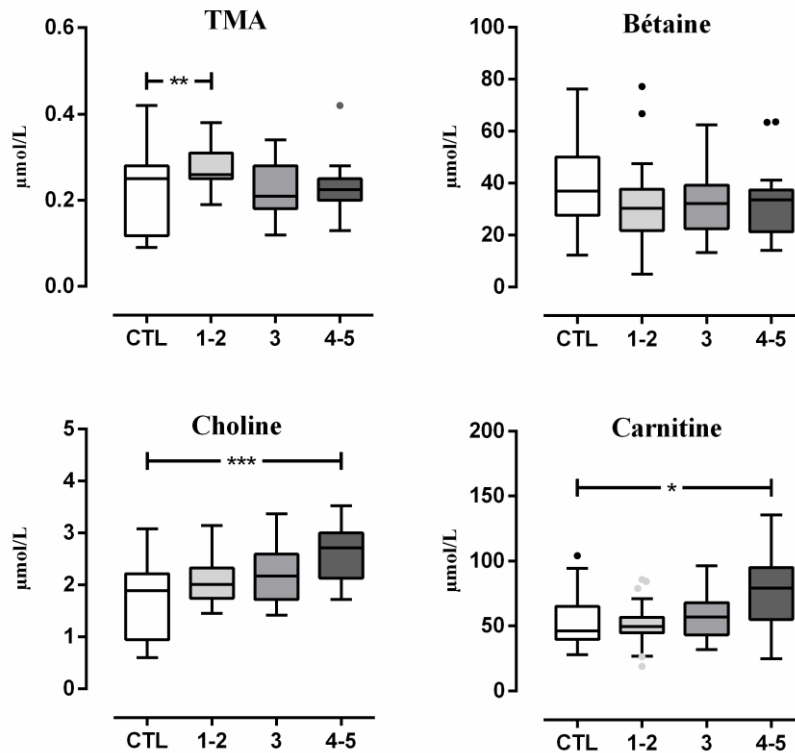
### V.2.1 TMAO et méthylamines

Les concentrations plasmatiques en TMAO sont significativement augmentées en fonction des niveaux de CKD et négativement corrélées avec le mGFR ( $r = -0,53$  ;  $p < 0,0001$ ) (**Figure 24**). Le TMAO est donc un marqueur potentiel de l'insuffisance rénale. L'insuffisance rénale pourrait aussi être un facteur confondant pour les analyses statistiques ultérieures visant à déterminer le rôle pronostique des concentrations plasmatiques élevées en TMAO dans la survenue des incidents cardiovasculaires. En revanche, aucune corrélation significative n'a été observée entre les concentrations plasmatiques en TMAO et les paramètres lipidiques des patients (**Tableau 8**).



**Figure 24 : TMAO plasmatique et corrélation de Spearman avec le taux de filtration glomérulaire mesurés chez les insuffisants rénaux.** En A, sont représentées les concentrations plasmatiques en TMAO en fonction des classes de CKD. En B, est représenté la corrélation de Spearman entre les concentrations plasmatiques en TMAO et le mGFR. Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données et tests de corrélations de Spearman.

Les métabolites associés au TMAO fluctuent de façon plus modérée avec l'insuffisance rénale (**Figure 25**). L'augmentation significative de la TMA plasmatique mesurée pour les stades 1-2 disparaît pour les stades plus élevés de la maladie. La choline et la carnitine augmentent principalement de manière significative au stade 4-5 de la maladie.



**Figure 25 : Concentrations plasmatiques des métabolites associés au TMAO en fonction de l'insuffisance rénale.** Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données.

Comme détaillé dans le **Tableau 8**, le mGFR corrèle négativement avec le TMAO, la choline et la carnitine (respectivement  $r = -0,52$  et  $p < 0,0001$  ;  $r = -0,26$  et  $p = 0,006$  ;  $r = -0,32$  et  $p = 0,0005$ ), et positivement avec la TMA. Il est également montré que ces métabolites sont positivement corrélés avec la créatinémie et l'urémie qui augmentent avec l'insuffisance rénale, celles-ci étant négativement associées au mGFR ( $r = -0,79$  et  $p < 0,0001$  ;  $r = -0,70$  et  $p < 0,0001$  respectivement) et connues comme marqueurs de la dysfonction rénale.

**Tableau 8 : Tableau de corrélation de Spearman du TMAO et ses métabolites associés plasmatiques chez les insuffisants rénaux.** D'après GraphPad Prism, après vérification de la normalité des données. En rose est mis en évidence les valeurs significativement corrélées, p(valeur) < 0,050. En orange clair est mis en évidence le coefficient de corrélation (r) dont les valeurs sont négativement corrélées, et en vert est mis en évidence les coefficients de corrélation représentant les corrélations positives.

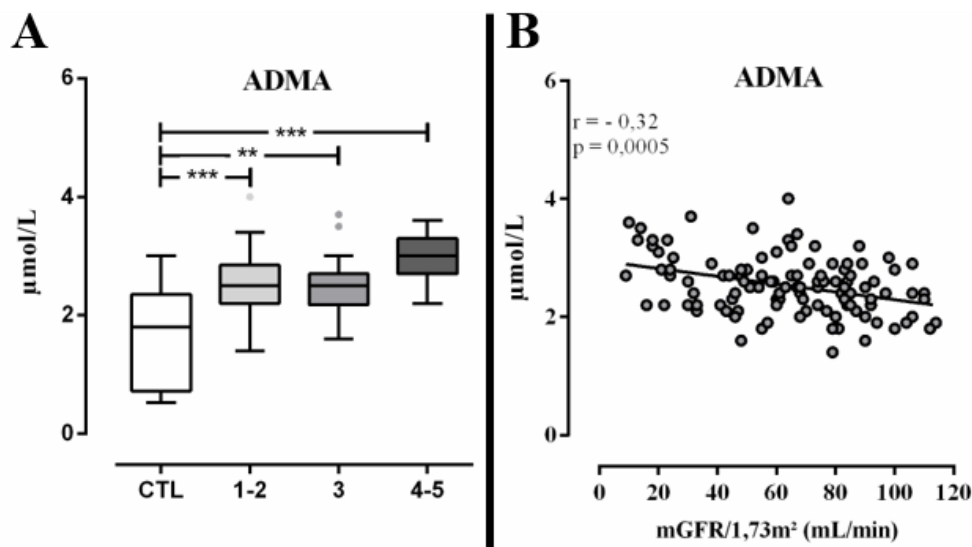
<b>p value / Coefficient corrélation (r)</b>	<b>mGFR</b>	<b>TG</b>	<b>CT</b>	<b>LDL-C</b>	<b>HDL-C</b>	<b>Créa</b>	<b>Urée</b>	<b>TMAO</b>	<b>TMA</b>	<b>Chol</b>	<b>Bét</b>	<b>Car</b>
<b>mGFR</b>		< 0,0001	0,020	0,001	0,794	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	0,006	0,257	0,0005
<b>TG</b>	-0,35		0,657	0,696	0,0001	0,0001	0,001	0,118	0,007	0,007	0,701	0,012
<b>CT</b>	0,22			< 0,0001	0,0001	0,002	0,495	0,129	0,289	0,436	0,915	0,475
<b>LDL-C</b>	0,31		0,94		0,249	0,001	0,191	0,114	0,113	0,276	0,188	0,380
<b>HDL-C</b>		-0,35	0,34			0,068	0,495	0,349	0,993	0,194	0,001	0,020
<b>Créatinine</b>	-0,79	0,36	-0,29	-0,31			< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0004	0,416	0,004
<b>Urée</b>	-0,70	0,31				0,69		< 0,0001	0,0033	0,0002	0,641	< 0,0001
<b>TMAO</b>	-0,52					0,53	0,61		0,259	0,073	0,685	0,016
<b>TMA</b>	0,37	-0,25				-0,42	-0,27			0,895	0,162	0,655
<b>Choline</b>	-0,26	0,25				0,32	0,34				0,268	< 0,0001
<b>Betaine</b>					-0,30							< 0,0001
<b>Carnitine</b>	-0,32	0,23			-0,22	0,26	0,46	0,22		0,38	0,37	

mGFR : taux de filtration glomérulaire moyen ; CT : cholestérol total ; TG : triglycérides ; HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de basse densité ; Créa : créatinine ; Chol : choline ; Bét : bétaïne ; Car : carnitine.

Ces résultats ont confirmé que le TMAO est un marqueur de l'insuffisance rénale et principalement excrété par la voie urinaire. En effet, lors d'une autre étude (données non présentées), des analyses urinaires ont étayé ces observations en démontrant que contrairement au TMAO, la TMA, la choline, la carnitine et la bêtaïne sont très probablement prises en charge par d'autres voies métaboliques avant d'être éliminés par les urines (transformations métaboliques), comme décrit dans la littérature<sup>9,116</sup>.

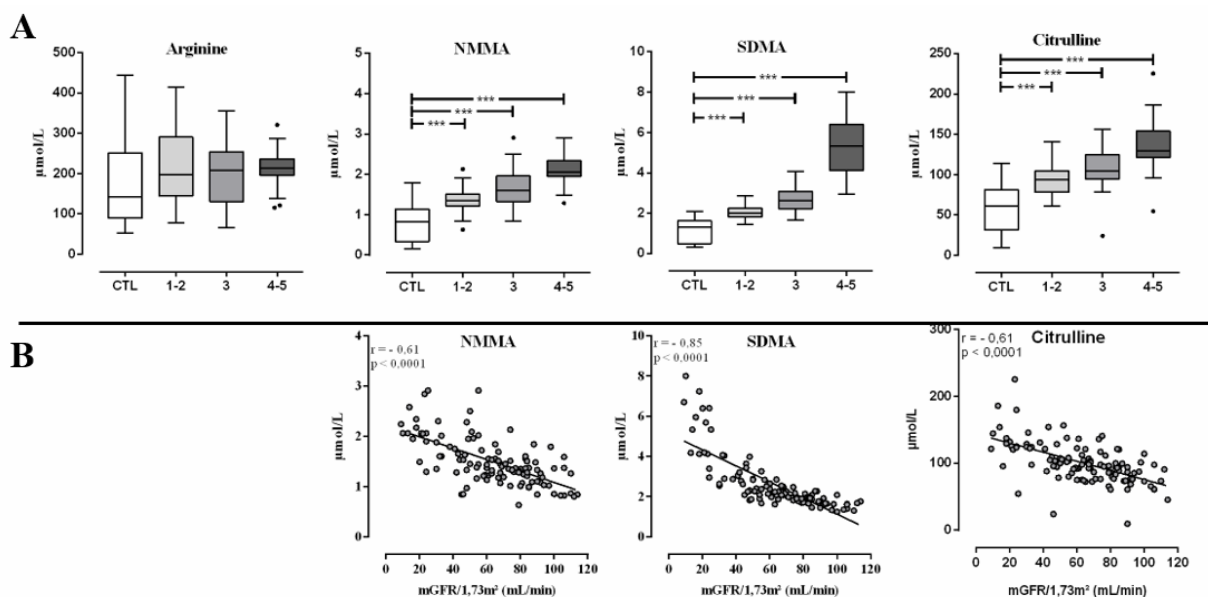
### V.2.2 ADMA et arginines méthylées

Le dosage plasmatique de l'ADMA a montré une augmentation significative de ses concentrations chez les insuffisants rénaux dès le stade 1-2 et une corrélation négative ( $r = -0,32$  ;  $p = 0,0005$ ) avec le mGFR (**Figure 26**).



**Figure 26 : Quantification de l'ADMA plasmatique et corrélation de Spearman avec le mGFR chez les insuffisants rénaux.** En A, sont représentées les concentrations plasmatiques de l'ADMA en fonction des stades de CKD. En B, est représenté la corrélation de Spearman entre l'ADMA plasmatique et le mGFR. Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données.

Les métabolites associés à l'ADMA ont également montré des variations significatives de leurs concentrations en fonction de l'insuffisance rénale (**Figure 27A**). Les concentrations plasmatiques en NMMA, SDMA et citrulline sont inversement corrélées avec le mGFR (**Figure 27 B**).



**Figure 27 : Métabolites associés à l'ADMA et leurs corrélations avec le mGFR chez les insuffisants rénaux.** En A, sont représentées les concentrations plasmatiques des métabolites par rapport aux classes de CKD. En B, sont représentées les corrélations significatives de Spearman entre les métabolites et le mGFR. Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données.

La SDMA corrèle très fortement avec le mGFR ( $r = -0,85$  ;  $p = 0,0002$ ) ce qui confirme que ce métabolite est fortement excrété dans les urines et donc un excellent marqueur de la dysfonction rénale. Les concentrations en NMMA et en citrulline plasmatiques augmentent également avec l'insuffisance rénale, mais les corrélations avec le mGFR sont plus faibles ( $r = -0,61$  ;  $p < 0,0001$ ).

L'indice de méthylation de l'arginine a été calculé à partir des concentrations plasmatiques en ADMA, SDMA et NMMA  $\{\text{ArgMI} = [(\text{ADMA} + \text{SDMA}) \div \text{NMMA}]\}$ , et nous a montré que la fonction rénale n'avait aucun impact sur la méthylation de l'arginine (données non présentées). Ainsi, soulignant que les modulations observées pour les métabolites de l'arginine sont simplement liées à la capacité d'excrétion des reins. En effet, les analyses urinaires réalisées en parallèle (données non présentées) ont confirmé que l'insuffisance rénale avait un impact puissant sur les concentrations plasmatiques en NMMA et SDMA, et montrant que la SDMA était un excellent marqueur de CKD. Ces analyses complémentaires ont également révélé que l'élimination de l'ADMA et de la citrulline de la circulation sanguine passait probablement par d'autres voies métaboliques. Les corrélations de Spearman (**Tableau 9**) confirment les résultats précédents. Cependant, il est à noter que l'ADMA, la NMMA, la SDMA et la citrulline corrèlent toutes positivement avec la créatinémie et l'urémie, marqueurs de dysfonction rénale.

**Tableau 9 : Corrélations de Spearman de l'ADMA et ses métabolites associés chez les insuffisants rénaux.** En rose est mis en évidence les valeurs significativement corrélées,  $p < 0,050$ . En orange clair est mis en évidence le coefficient de corrélation (r) dont les valeurs sont négativement corrélées, et en vert est mis en évidence les coefficients de corrélation représentant les corrélations positives.

<b>p value / Coefficient corrélacion (r)</b>	<b>mGFR</b>	<b>TG</b>	<b>CT</b>	<b>LDL-C</b>	<b>HDL-C</b>	<b>Créa</b>	<b>Urée</b>	<b>NMMA</b>	<b>ADMA</b>	<b>SDMA</b>	<b>Arg</b>	<b>Cit</b>
<b>mGFR</b>		<b>0,0002</b>	<b>0,020</b>	<b>0,001</b>	<b>0,794</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0002</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,268</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>TG</b>	-0,35		<b>0,657</b>	<b>0,696</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,095</b>	<b>0,522</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,275</b>	<b>0,0552</b>
<b>CT</b>	0,22			<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,495</b>	<b>0,018</b>	<b>0,270</b>	<b>0,071</b>	<b>0,004</b>	<b>0,7812</b>
<b>LDL-C</b>	0,31		0,94		<b>0,249</b>	<b>0,001</b>	<b>0,191</b>	<b>0,005</b>	<b>0,325</b>	<b>0,012</b>	<b>0,001</b>	<b>0,5081</b>
<b>HDL-C</b>		-0,35	0,34			<b>0,068</b>	<b>0,495</b>	<b>0,486</b>	<b>0,708</b>	<b>0,462</b>	<b>0,734</b>	<b>0,3869</b>
<b>Créatinine</b>	-0,79	0,36	-0,29	-0,31			<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,024</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,228</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Urée</b>	-0,70	0,31				0,69		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,681</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>NMMA</b>	-0,61		-0,22	-0,26		0,54	0,54		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,321</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>ADMA</b>	-0,34					0,21	0,36	0,57		<b>0,0002</b>	<b>0,888</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>SDMA</b>	-0,86	0,36		-0,23		0,81	0,70	0,59	0,34		<b>0,414</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Arginine</b>			0,27	0,32								<b>0,5086</b>
<b>Citrulline</b>	-0,57					0,48	0,50	0,40	0,40	0,49		

mGFR : taux de filtration glomérulaire moyen ; CT : cholestérol total ; TG : triglycérides ; HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de basse densité ; Créa : créatinine ; Arg : arginine ; Cit : citrulline.

### V.2.3 Conclusion des analyses dans le cas des insuffisantes rénaux

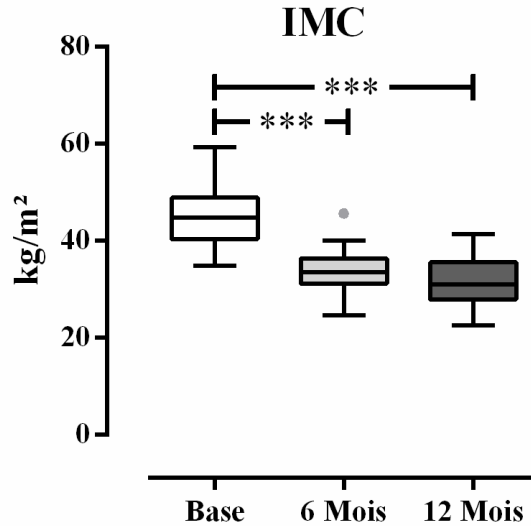
Cette première étude a révélé que le TMAO était fortement associé à la fonction rénale. Des concentrations plasmatiques élevées en TMAO pourraient donc être la conséquence d'une mauvaise excrétion urinaire de ce composé. La fonction rénale sera donc un paramètre confondant important à prendre en compte pour les futures études prospectives visant à déterminer le rôle du TMAO circulant dans la survenue des événements cardiovasculaires, en particulier chez les patients DT2 pour lesquels la fonction rénale est couramment altérée avec la pathologie.

A l'inverse, l'association entre l'ADMA et la fonction rénale semble moins évidente mais tout de même présente. Dans le groupe des arginines méthylées, c'est surtout la SDMA qui est fortement associée à la fonction rénale. Comme la SDMA et l'ADMA proviennent de voies métaboliques très proches, la fonction rénale sera tout de même un paramètre confondant à prendre en compte pour les études prospectives.

## V.3 Modulation des marqueurs dans l'obésité

Les résultats préliminaires obtenus chez les patients obèses ont montré que les paramètres lipidiques, hépatiques et d'insulino-résistance sont améliorés après chirurgie bariatrique (**Tableau 3**). Des différences significatives ont été observées entre les deux types de chirurgies sleeve et by-pass pour le cholestérol total (CT) ( $p = 0,0019$ ), le LDL-C ( $p = 0,0007$ ) mais également les transaminases (ASAT :  $p = 0,016$  ; ALAT :  $p = 0,046$ ). En effet, le CT a été diminué de 15% après by-pass contre 5% après une sleeve, le LDL-C de -21% après by-pass contre -7% après une sleeve, alors que les transaminases ont été diminuées plus fortement après une sleeve qu'après un by-pass (ASAT-sleeve, -36% / ASAT-by pass, -20% ; ALAT-sleeve, -60% / ALAT-by pass, -42%). La chirurgie par by-pass est déjà connue pour entraîner une plus forte diminution du LDL-C et du cholestérol total qu'une sleeve, même si l'amélioration du profil lipidique est avéré dans les deux cas chez les patients obèses<sup>117</sup>. En effet, l'IMC est bien diminué significativement de -23% ( $p < 0,0001$ ) après 6 mois de chirurgie et de -29% après 12 mois de chirurgie (**Figure 28**). Cette amélioration de l'IMC des patients est associée aux paramètres lipidiques, hépatiques et à l'indice de résistance à l'insuline (**Tableau 10**). En effet, les résultats des transaminases montrent une amélioration du système hépatique et comme décrit dans la littérature la sleeve a un effet plus direct et est la technique privilégiée dans le cas des patients obèses atteints de cirrhose<sup>118</sup>.



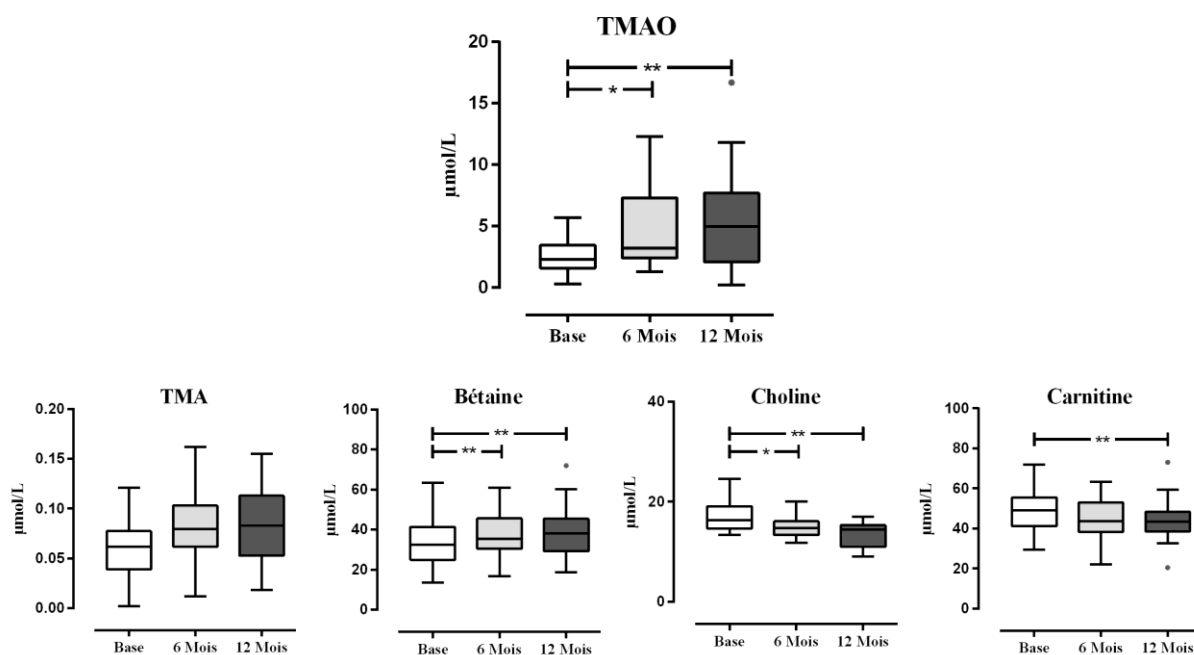


**Figure 28 : Evaluation de l'IMC après chirurgie bariatrique.** L'IMC des patients obèses est significativement diminué dès 6 mois après chirurgie et continue à s'améliorer dans les temps. Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données.

### V.3.1 TMAO et méthylamines

Aucune différence significative n'a été observée sur les résultats des dosages sériques entre les deux chirurgies bariatriques réalisées.

Le TMAO et la bétaine sont augmentés significativement dès 6 mois après la chirurgie, de +63% ( $p = 0,02$ ) pour le TMAO sérique et +13% ( $p = 0,003$ ) pour la bétaine sérique alors que la choline et la carnitine sériques sont diminuées de -17% ( $p = 0,001$ ) et de -10% ( $p = 0,005$ ), respectivement (**Figure 29**).



**Figure 29 : Dosages du TMAO et ses métabolites associés chez les patients obèses avant/après chirurgie bariatrique.** Modulation des métabolites avant puis après 6 et 12 mois de chirurgie bariatrique. Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données.

Les concentrations sériques du TMAO avant et après chirurgie bariatrique corrént faiblement mais positivement avec le HDL-C ( $r = 0,23$  ;  $p = 0,035$ ) et négativement avec le LDL-C ( $r = -0,24$  ;  $p = 0,025$ ). Les corrélations de Spearman ont aussi montré que la chirurgie bariatrique améliore les paramètres du syndrome métabolique car l'IMC est corrélé positivement avec les TG ( $r = 0,38$  ;  $p = 0,0003$ ), l'ASAT ( $r = 0,35$  ;  $p = 0,0011$ ), l'ALAT ( $r = 0,42$  ;  $p = 0,0001$ ), l'indice de résistance à l'insuline (HOMA-IR) ( $r = 0,59$  ;  $p < 0,0001$ ) (**Tableau 10**).

**Tableau 10 : Corrélations de Spearman entre le TMAO et ses métabolites associés et les paramètres cliniques des patients obèses.** En rose est mis en évidence les valeurs significativement corrélées,  $p < 0,05$ . En orange clair est mis en évidence le coefficient de corrélation (r) dont les valeurs sont négativement corrélées, et en vert sont mis en évidence les coefficients de corrélation représentant les corrélations positives.

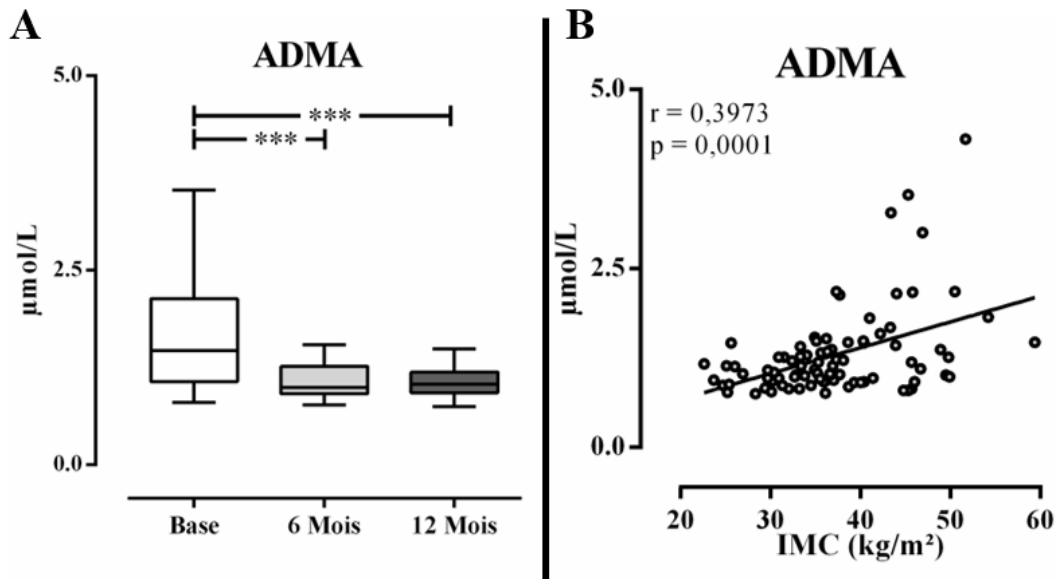
<b>p value / Coefficient corrélation (r)</b>	<b>IMC</b>	<b>CT</b>	<b>TG</b>	<b>HDL-C</b>	<b>LDL-C</b>	<b>ASAT</b>	<b>ALAT</b>	<b>HOMA- IR</b>	<b>TMAO</b>	<b>Chol</b>	<b>Bét</b>	<b>Car</b>
<b>IMC</b>		<b>0,694</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,2155</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,6413</b>	<b>0,025</b>	<b>0,621</b>	<b>0,387</b>
<b>CT</b>			<b>0,0002</b>	<b>0,0056</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,2486</b>	<b>0,1509</b>	<b>0,9551</b>	<b>0,3770</b>	<b>0,028</b>	<b>0,847</b>	<b>0,849</b>
<b>TG</b>	<b>0,38</b>	<b>0,39</b>		<b>0,0040</b>	<b>0,0051</b>	<b>0,0323</b>	<b>0,0009</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,6537</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,950</b>	<b>0,123</b>
<b>HDL-C</b>	<b>-0,34</b>	<b>0,30</b>	<b>-0,31</b>		<b>0,5437</b>	<b>0,4037</b>	<b>0,0186</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0354</b>	<b>0,153</b>	<b>0,558</b>	<b>0,036</b>
<b>LDL-C</b>		<b>0,91</b>	<b>0,30</b>			<b>0,3007</b>	<b>0,1124</b>	<b>0,7691</b>	<b>0,0253</b>	<b>0,056</b>	<b>0,696</b>	<b>0,304</b>
<b>ASAT</b>	<b>0,35</b>		<b>0,23</b>				<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,3351</b>	<b>0,006</b>	<b>0,475</b>	<b>0,001</b>
<b>ALAT</b>	<b>0,42</b>		<b>0,35</b>	<b>-0,25</b>		<b>0,83</b>		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0989</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,257</b>	<b>0,0003</b>
<b>HOMA-IR</b>	<b>0,59</b>		<b>0,54</b>	<b>-0,47</b>		<b>0,37</b>	<b>0,45</b>		<b>0,1594</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,007</b>	<b>0,004</b>
<b>TMAO</b>				<b>0,23</b>	<b>-0,24</b>					<b>0,377</b>	<b>0,003</b>	<b>0,198</b>
<b>Choline</b>	<b>0,28</b>	<b>0,28</b>	<b>0,51</b>			<b>0,34</b>	<b>0,46</b>	<b>0,46</b>			<b>0,744</b>	<b>0,0003</b>
<b>Bétaïne</b>								<b>-0,29</b>	<b>0,31</b>			<b>0,496</b>
<b>Carnitine</b>				<b>-0,23</b>		<b>0,34</b>	<b>0,38</b>	<b>0,31</b>		<b>0,44</b>		

IMC : indice de masse corporelle ; CT : cholestérol total ; TG : triglycérides ; HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de basse densité ; ASAT : aspartate aminotransférase ; ALAT : alanine aminotransférase ; HOMA-IR : Indice de résistance à l'insuline ; *homeostasis model accessment of insulin resistance* en  $\mu\text{kat/L}$  : unité de mesure catalytique du système international (<https://www.bipm.org>) ; Chol : choline ; Bét : bétaïne ; Car : carnitine.

### V.3.2 ADMA et arginines méthylées

Aucune différence significative n'a été observée sur les concentrations des métabolites entre les deux chirurgies bariatriques réalisées.

Les analyses ont montré une forte diminution des concentrations plasmatiques de l'ADMA (-37% ;  $p < 0,0001$ ) positivement corrélées à l'IMC des patients (**Figure 30**).



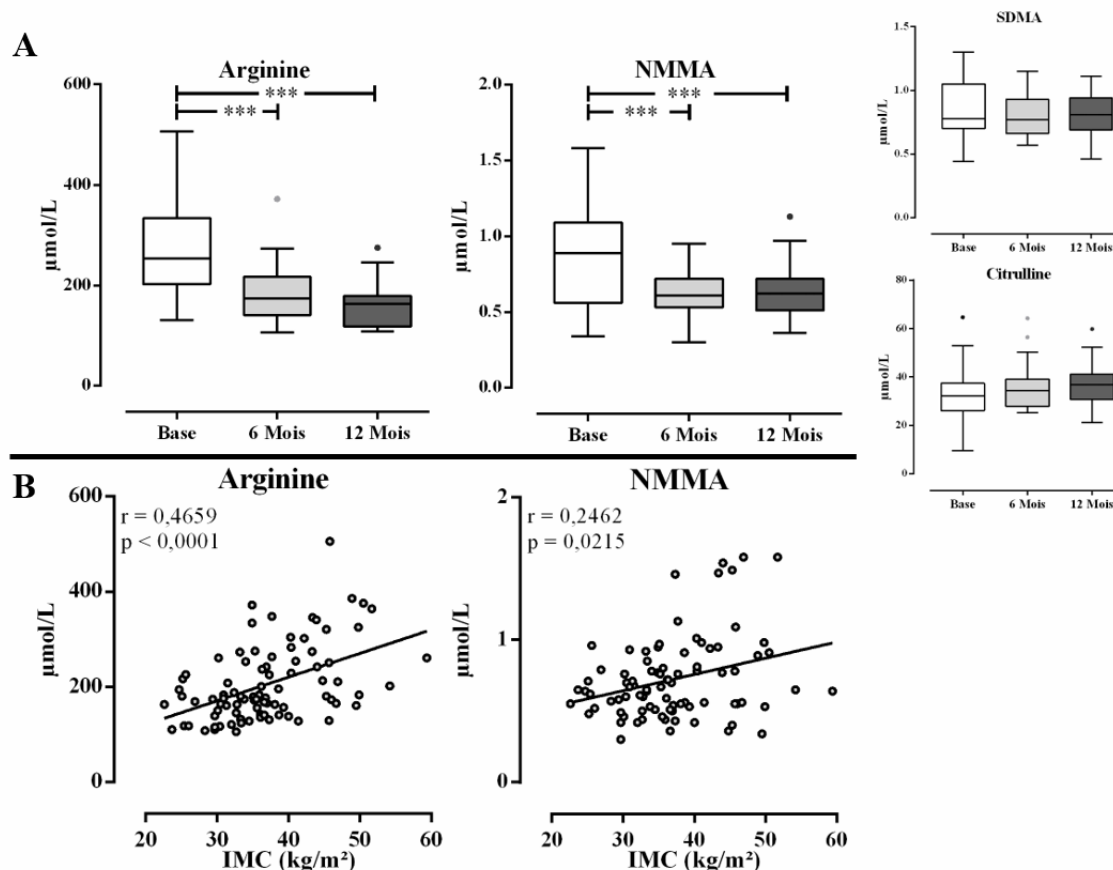
**Figure 30 : Quantification de l'ADMA sérique et corrélation de Spearman avec l'indice de masse corporelle des patients obèses. En A**, sont représentées les concentrations plasmatiques de l'ADMA avant et après 6 et 12 mois l'intervention chirurgicale. **En B**, est représentée la corrélation de Spearman entre l'ADMA sérique et l'IMC. Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données.

Les autres métabolites fluctuent également avec le traitement chirurgical. L'arginine diminue de -35% ( $p < 0,0001$ ) et la NMMA de -30% ( $p = 0,0215$ ) après chirurgie bariatrique, tandis que la SDMA et la citrulline ne sont pas affectées par l'intervention (**Figure 31**). Ces résultats suggèrent que l'arginine, la NMMA et l'ADMA pourraient être des marqueurs associés au syndrome métabolique (**Tableau 11**).

**Tableau 11 : Corrélations de Spearman entre l'ADMA et ses métabolites associés et les paramètres cliniques des patients obèses ayant subi une chirurgie bariatrique.** En rose sont mises en évidence les valeurs significativement corrélées,  $p < 0,05$ . En orange clair est mis en évidence le coefficient de corrélation (r) dont les valeurs sont négativement corrélées, et en vert sont mis en évidence les coefficients de corrélation représentant les corrélations positives.

p value / Coefficient corrélation (r)	IMC	CT	TG	HDL-C	LDL-C	ASAT	ALAT	HOMA-IR	Arg	NMMA	ADMA	SDMA	Cit
IMC		0,694	<b>0,0003</b>	<b>0,002</b>	0,215	<b>0,001</b>	<b>0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,022</b>	<b>0,0001</b>	0,5920	0,900
CT	0,04		<b>0,0002</b>	<b>0,006</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,249	0,1509	0,9551	<b>0,035</b>	0,183	0,512	0,9388	0,080
TG	0,38	0,39		<b>0,004</b>	<b>0,005</b>	<b>0,032</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,017</b>	<b>0,006</b>	0,5549	0,278
HDL-C	-0,34	0,30	-0,31		0,5437	0,404	<b>0,019</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,018</b>	0,347	0,350	0,5789	0,441
LDL-C	0,14	0,91	0,30	0,07		0,301	0,1124	0,7691	<b>0,009</b>	<b>0,037</b>	0,166	0,8311	<b>0,038</b>
ASAT	0,35	0,13	0,23	-0,09	0,11		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,021</b>	<b>0,017</b>	<b>0,001</b>	0,0738	<b>0,002</b>
ALAT	0,42	0,16	0,35	-0,25	0,17	0,83		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,015</b>	0,056	<b>0,008</b>	0,3520	<b>0,003</b>
HOMA-IR	0,59	-0,01	0,54	-0,47	0,03	0,37	0,45		<b>0,000</b>	<b>0,040</b>	<b>0,005</b>	0,6889	0,350
Arginine	0,47	0,23	0,46	-0,26	0,29	0,25	0,26	0,41		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,006</b>	0,809
NMMA	0,25	0,14	0,26	-0,10	0,23	0,26	0,21	0,22	0,67		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,094
ADMA	0,40	0,07	0,29	-0,10	0,15	0,35	0,28	0,30	0,56	0,67		<b>&lt; 0,0001</b>	0,1466
SDMA	0,06	0,01	0,06	0,06	-0,02	0,19	0,10	0,04	0,28	0,57	0,48		0,0867
Citrulline	-0,01	-0,19	-0,12	0,08	-0,23	0,33	0,32	-0,10	0,03	0,17	0,15	0,18	

IMC : indice de masse corporelle ; CT : cholestérol total ; TG : triglycérides ; HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de basse densité ; ASAT : aspartate aminotransférase ; ALAT : alanine aminotransférase ; HOMA-IR : Indice de résistance à l'insuline ; *homeostasis model assessment of insulin resistance* en  $\mu\text{kat/L}$  : unité de mesure catalytique du système international (<https://www.bipm.org>) ; Arg : arginine ; Cit : citrulline.



**Figure 31 : Quantification des métabolites associés à l'ADMA et corrélation de Spearman avec l'indice de masse corporelle chez les patients obèses. En A, sont représentées les concentrations plasmatiques des métabolites associés à l'ADMA. En B, sont représentées les corrélations de Spearman des métabolites significativement impactés par le traitement chirurgical par rapport à l'IMC. Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données et tests de corrélations de Spearman.**

Les corrélations de Spearman ont montré une corrélation positive de l'ADMA avec les TG ( $r = 0,29$  ;  $p = 0,006$ ), les transaminases ASAT ( $r = 0,35$  ;  $p = 0,001$ ) et ALAT ( $r = 0,28$  ;  $p = 0,008$ ) et l'HOMA-IR ( $r = 0,30$  ;  $p = 0,005$ ). Par ailleurs et comme attendu, les concentrations sériques de l'ADMA sont fortement corrélées à celles de ses métabolites associés : l'arginine ( $r = 0,56$  ;  $p < 0,0001$ ), la NMMA ( $r = 0,67$  ;  $p < 0,0001$ ) et la SDMA ( $r = 0,57$  ;  $p < 0,0001$ ). L'arginine et la NMMA sont corrélées positivement aux mêmes paramètres cliniques que l'ADMA avec en plus des corrélations significatives avec le LDL-C, ce qui renforce leur capacité à être de bons marqueurs de l'obésité. A l'inverse, la SDMA et la citrulline ne corrélaient pas avec les paramètres lipidiques et hépatiques, confirmant que ces métabolites sont probablement pris en charge par d'autres voies métaboliques. Ces analyses ont également permis de confirmer, dans

notre étude, que l'obésité sévère est bien corrélée à l'IMC, aux TG, aux transaminases et à l'HOMA-IR.

L'indice de méthylation de l'arginine calculé à partir des concentrations sériques en ADMA, SDMA et NMMA a confirmé que l'obésité morbide n'avait aucun impact sur la méthylation de l'arginine. Ainsi, soulignant que les modulations observées des métabolites méthylés de l'arginine sont principalement liés à la dyslipidémie engendrée par l'état d'obésité morbide et non due à une augmentation de la méthylation de l'arginine par la protéine méthyltransférase (PRMT).

### **V.3.3 Conclusion des analyses dans les cas de l'obésité**

Cette seconde étude a montré que l'ADMA est un bon marqueur de l'obésité, de l'insulino-résistance et des troubles hépatiques sous-jacents. Les paramètres lipidiques et hépatiques seront donc à prendre en compte pour les futures études prospectives visant à déterminer le rôle de l'ADMA circulant dans la survenue des événements cardiovasculaires, en particulier chez les patients DT2 pour lesquels ces paramètres sont traditionnellement altérés.

A l'inverse, le TMAO et ses partenaires métaboliques sont légèrement augmentés après chirurgie bariatrique et pourraient donc intervenir dans d'autres voies métaboliques. L'augmentation du TMAO pourrait aussi être liée au régime alimentaire des patients ou à la composition de la flore intestinale qui a certainement changé après chirurgie bariatrique. D'autres études seraient nécessaires pour mieux comprendre l'augmentation des concentrations sériques en TMAO après chirurgie bariatrique chez le patient obèse.

## **V.4 Rôle pronostique des marqueurs dans le risque cardiovasculaire des patients diabétiques.**

Les 1468 patients DT2 de la cohorte SURDIAGENE ont été suivis prospectivement pendant 7 ans. Au total, 403 patients ont présenté un MACE (AVC, mort CV et ou infarctus du myocarde) durant le suivi.

Les différents marqueurs ont été dosés dans les échantillons plasmatiques (**Tableau 12**). Les résultats des différents dosages du TMAO et de l'ADMA et de leurs partenaires métaboliques ont montrés que la majorité des molécules était augmentée significativement chez les DT2 ayant présenté des MACE, notamment le TMAO, la SDMA, la citrulline et l'ADMA.

**Tableau 12 : Modulations des différents métabolites en fonction des MACE.** Tests statistiques de Mann-Whitney après vérification de la normalité des données. Les valeurs sont présentées e, moyennes  $\pm$  écart-type.

Métabolites ( $\mu\text{M}$ )	DT2	DT2+MACE	Fold change (%)	p (value)
TMA	0,75 $\pm$ 0,20	0,75 $\pm$ 0,20	-1	0,3486
TMAO	7,62 $\pm$ 5,00	9,18 $\pm$ 6,00	+21	0,0003
Betaine	32,1 $\pm$ 11,0	33,8 $\pm$ 12,0	+5	0,0480
Choline	1,47 $\pm$ 0,40	1,61 $\pm$ 0,50	+10	< 0,0001
Carnitine	43,6 $\pm$ 12,0	44,8 $\pm$ 14,0	+3	0,2498
Arginine	43,6 $\pm$ 19,0	45,9 $\pm$ 19,0	+5	0,0369
NMMA	0,23 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,05	+3	0,0390
ADMA	0,82 $\pm$ 0,20	0,91 $\pm$ 0,20	+10	< 0,0001
SDMA	0,67 $\pm$ 0,2,	0,88 $\pm$ 0,30	+31	< 0,0001
Citrulline	37,7 $\pm$ 16,0	46,8 $\pm$ 20,0	+24	< 0,0001

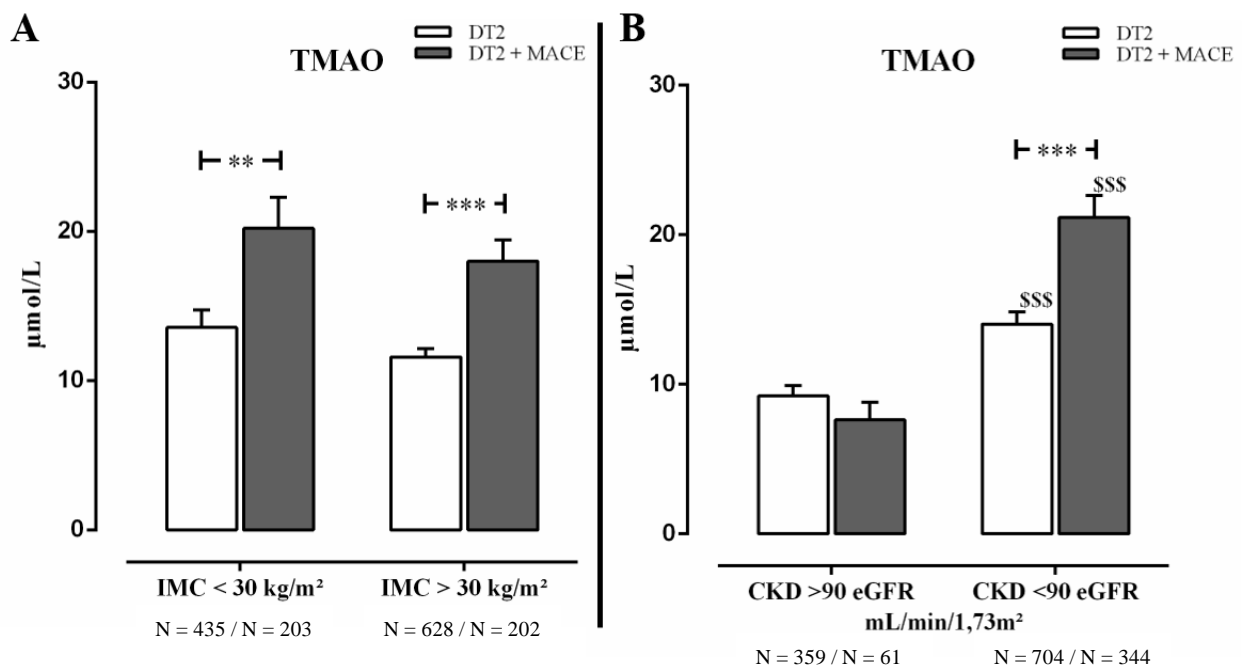
Il a été décrit dans la littérature que le TMAO et l'ADMA contribuait à l'athérosclérose et seraient étroitement associés au risque de MCV. Ils pourraient donc être des marqueurs d'intérêts pour la prévision des MCVs<sup>57,58,76,79</sup>. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur l'analyse statistique des données concernant le TMAO et l'ADMA afin d'évaluer le pouvoir pronostique de ces marqueurs sur la prévision et/ou la stratification du risque CV. Les informations obtenues lors des deux précédentes études nous ont permis de mieux appréhender les analyses.

#### V.4.1 Le TMAO

Dans le DT2, les concentrations plasmatiques en TMAO sont significativement augmentées d'environ 50% chez les patients ayant présentés un MACE, qu'ils soient obèses (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>, n = 830) ou non obèses (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>, n = 638 (**Figure 32A**)). Par ailleurs, cette analyse confirme que les concentrations en TMAO ne sont pas fortement liées à l'obésité des patients car aucune différence significative n'est observée entre les concentrations plasmatiques de TMAO des patients obèses DT2 et des patients non obèses DT2 (respectivement ; 7,8  $\mu\text{M} \pm 0,012$  et 8,3  $\mu\text{M} \pm 0,017$  ; p > 0,9999). L'obésité des patients n'intervient donc pas dans les fluctuations observées des concentrations en TMAO, mais nos résultats confirment que le TMAO est un marqueur d'évènements cardiovasculaires.



De plus, les concentrations plasmatiques en TMAO sont également augmentées significativement d'environ 50% chez les DT2 insuffisants rénaux de stades 2 à 5 (eGFR < 90 mL/min/1,73m<sup>2</sup>) ayant présenté des MACE (**Figure 32B**). Cette augmentation n'est pas observée au sein du sous-groupe DT2 ne présentant pas de troubles rénaux (eGFR > 90 mL/min/1,73m<sup>2</sup>). Ces résultats confirment que l'augmentation du TMAO plasmatique est liée à l'insuffisance rénale mais que cette élévation de concentrations pourrait être déterminante dans le risque de développer une maladie cardiovasculaire.



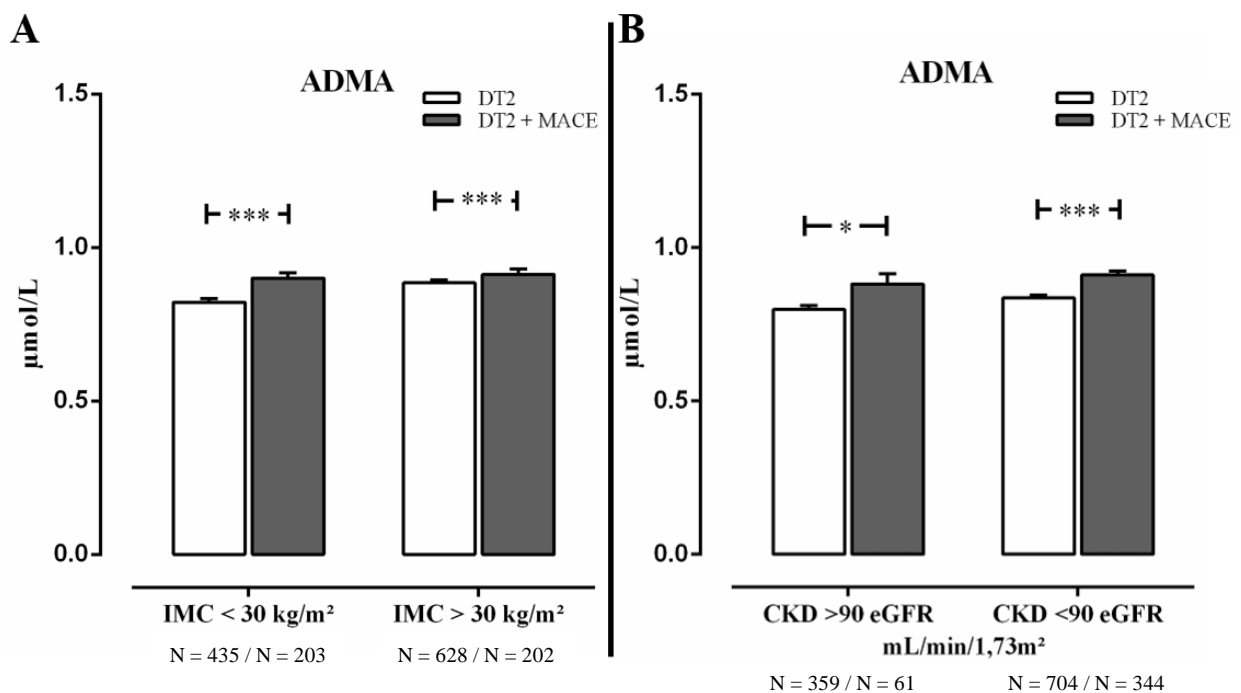
**Figure 32 : Modulations du TMAO en fonction de l'obésité et de l'insuffisance rénale.** En A, sont représentées les concentrations du TMAO en fonction du statut « non obèses ». En B, sont représentées les concentrations du TMAO en fonction de l'insuffisance rénale, Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données, résultats exprimés en moyenne ± SEM. \*\* : p < 0,01 et \*\*\* : p < 0.001 DT2 vs DT2+MACE. \$\$\$ : p < 0,001 DT2 (eGFR > 90 unités) vs DT2 (eGFR < 90 unités).

#### V.4.2 L'ADMA

Les concentrations plasmatiques en ADMA sont augmentées d'environ 8% chez les patients DT2 ayant présenté un MACE, qu'ils soient obèses ou non (**Figure 33A**). En revanche, cette augmentation n'est pas liée à l'obésité car les groupes ne présentent pas de différences significatives, comme observé pour le TMAO. Ainsi, l'obésité des patients DT2 ne semble pas

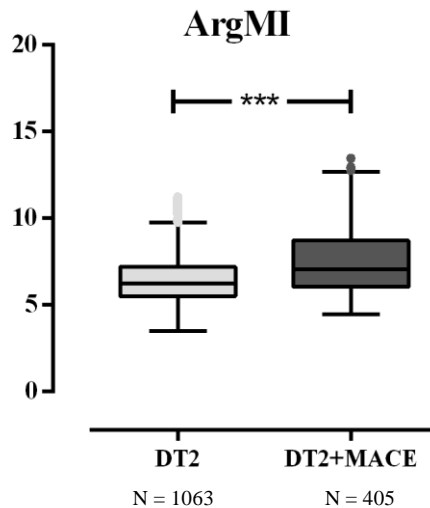
intervenir dans les fluctuations observées des concentrations en ADMA, mais nous confirmons que l'ADMA circulante est liée aux événements cardiovasculaires.

Dans le cas de l'insuffisance rénale (**Figure 33B**), les concentrations en ADMA sont augmentées d'environ 10% avec le MACE quel que soit le statut de patients. Ces résultats confirment que les concentrations plasmatiques en ADMA sont peu modulées par la fonction rénale mais qu'elles sont liées aux événements cardiovasculaires.



**Figure 33 : Modulations de l'ADMA en fonction de l'obésité et de l'insuffisance rénale.** En A, sont représentées les concentrations de l'ADMA en fonction de l'obésité, chez les patients DT2 non. En B, sont représentées les concentrations en ADMA en fonction de la fonction rénale Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données, résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Par ailleurs, l'indice de méthylation de l'arginine est significativement associé aux MACE chez les patients DT2 (**Figure 34**).



**Figure 34 : Estimation de l'indice de méthylation de l'arginine chez les patients DT2 ayant présenté ou non des MACEs.** Tests statistiques de Kruskal-Wallis après vérification de la normalité des données.

### V.4.3 Corrélations multiparamétriques

Nous nous sommes intéressés à l'association des paramètres lipidiques et hépatiques des patients DT2 avec les marqueurs d'intérêt connus et identifiés dans ce projet : le TMAO, l'ADMA en tant que potentiels métabolites précurseurs des MCV, mais aussi la SDMA car ce métabolite est un bon marqueur de l'insuffisance rénale. Ces métabolites ont montré de fortes corrélations négatives avec l'eGFR, confirmant nos précédents résultats. Le TMAO et l'ADMA sont également corrélés avec le CT, les TG, l'HDL-C et le LDL-C et les enzymes hépatiques. Cependant, ces corrélations doivent être interprétées avec prudence car elles requièrent une analyse statistique fine, diligentée auprès de biostatisticiens, qui nécessite la prise en compte de l'ensemble des variables cliniques et anthropométriques classiques prédictives du risque vasculaire des patients DT2. (**Tableau 13**).

**Tableau 13 : Corrélations des métabolites marqueur des risques de MCV et de l'insuffisance rénale.** Tests statistiques de Spearman après vérification de la normalité des données.

<b>Coefficient corrélation ; r / (P value)</b>	<b>TMAO (<math>\mu</math>M)</b>	<b>ADMA (<math>\mu</math>M)</b>	<b>SDMA (<math>\mu</math>M)</b>
<b>eGFR</b>	-0,42 (< 0,0001)	-0,22 (< 0,0001)	-0,65 (< 0,0001)
<b>CT</b>	-	-0,06 (0,0160)	-0,11 (< 0,0001)
<b>TG</b>	+0,09 (0,0008)	-	-
<b>HDL-C</b>	-0,10 (0,0001)	-0,08 (0,0017)	-
<b>LDL-C</b>	-	-	-0,11 (< 0,0001)
<b>ASAT</b>	-0,09 (0,0013)	-0,06 (0,0236)	-0,07 (0,0161)
<b>ALAT</b>	-0,15 (< 0,0001)	-0,14 (< 0,0001)	-0,21 (< 0,0001)

eGFR : taux de filtration glomérulaire estimé ; CT : cholestérol total ; TG : triglycérides ; HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de basse densité ; ASAT : aspartate aminotransférase ; ALAT : alanine aminotransférase.

#### **V.4.4 Conclusion et perspectives sur le rôle pronostique du TMAO et de l'ADMA dans le risque cardiovasculaire des patients diabétiques**

Nos résultats ont montré que des concentrations plasmatiques élevées en TMAO et en ADMA pourraient être associées aux événements cardiovasculaires chez les patients DT2. Des concentrations élevées en ADMA et TMAO ne semblent pas nécessairement associées à l'état dyslipémique des patients diabétiques. En revanche, la fonction rénale impacte les niveaux circulants de TMAO alors que son action sur l'ADMA semble plus limitée.

La relation entre le TMAO et le risque cardiovasculaire des patients DT2 a été évaluée dans des modèles statistiques multivariés (modèle de Cox). Les concentrations plasmatiques élevées en TMAO (4<sup>ème</sup> quartile) se sont avérées prédictives des MACEs en comparaison des 3 premiers quartiles. Après ajustements avec les marqueurs traditionnels du risque cardiovasculaire et ceux de la fonction rénale, le rapport de risque (*hazard ratio* : HR) était de 1,32 (IQR : 1,02-1,70 ;  $p = 0,0325$ ). Ces résultats sont en cours de publication (soumis au journal *Diabetes Care*).

Les analyses multivariées sont actuellement en cours au CIC de Poitiers pour les données relatives aux arginines méthylées et en particulier l'ADMA.

## VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous avons mis en place des méthodes LC-MS/MS permettant la quantification du TMAO et de l'ADMA, molécules récemment identifiées comme potentiellement impliquées dans le développement des MCVs. Le but de cette étude était de confirmer leur intérêt dans les pathologies CVs, en particulier chez des patients atteints d'un DT2, maladie chronique à haut risque.

Le développement du dosage du TMAO et de ses métabolites associés<sup>108,112</sup> a permis au laboratoire d'acquérir une meilleure maîtrise de la technologie de séparation des molécules par interactions hydrophiles, alors que le développement de la méthode d'analyse de l'ADMA et de ses métabolites associés<sup>75</sup> a permis au laboratoire d'élargir son spectre d'analyse des acides aminés athérogènes en appréhendant les différentes formes moléculaires issues de la méthylation de l'arginine (NMMA, ADMA et SDMA). Les méthodes d'analyses et de quantification ont été validées en termes de reproductibilité, de répétabilité et l'effet matrice sur les diverses molécules a été déterminée. Nous avons également noté l'importance de la matrice à analyser (plasma et sérum). En effet, les effets matrices associés au sérum entraînent une surestimation de certains métabolites (ex : la choline) par rapport au plasma. Il est donc essentiel de comparer les dosages réalisés sur des échantillons de même nature pour le traitement des données et la comparaison de différents groupes d'étude au sein d'une même cohorte ou de plusieurs cohortes entre elles.

Les dosages ont ensuite été appliqués à trois cohortes de patients atteints 1) d'insuffisance rénale, ou 2) d'obésité morbide avant/après contrôle métabolique (chirurgie bariatrique) ou 3) d'un diabète de type 2 avec suivi prospectif sur 7 ans et enregistrement des événements CVs majeurs. Au travers de ces trois cohortes, nous avons cherché à confirmer ou à infirmer les résultats déjà rapportés dans la littérature pour le TMAO et l'ADMA<sup>57-59,75-77</sup>. Nous avons également cherché à évaluer la modulation de ces marqueurs dans des cas physiopathologiques extrêmes afin de mieux comprendre les interconnexions métaboliques entre les molécules cibles et leurs métabolites associés, et déterminer d'éventuels facteurs confondants pour les analyses prospectives visant à établir leur rôle pronostique sur la survenue des événements CVs.

Au travers de ces analyses, nous avons montré que le TMAO était un marqueur puissant de l'insuffisance rénale par ses multiples associations avec les paramètres de la fonction rénale (mGFR, créatinémie et urémie), tandis que ses précurseurs endogènes étaient certainement pris en charge par d'autres voies métaboliques, exemple de la bétaine peut-être donneuse de méthyle

dans la voie de la bétaine homocystéine méthyltransférase. Les fluctuations observées pour la choline (taux élevés chez les patients atteints de néphropathie) sont cohérentes avec la littérature où il est rapporté que les taux de choline sont plus élevés avant dialyse chez les insuffisants rénaux<sup>119,120</sup>. La choline est un nutriment essentiel, oxydée par le foie et le rein en bétaine. Au niveau neuronal, la choline entre dans la composition des neurotransmetteurs et est associée négativement à la maladie d'Alzheimer<sup>121</sup> et positivement au cancer colorectal<sup>122</sup>. En revanche, les résultats obtenus sur la carnitine sont plus contrastés au regard de la littérature. La carnitine provient de sources alimentaires ou est produite par biosynthèse endogène à partir de la lysine et de la méthionine hépatique et rénale. La carnitine transporte les acides gras cytosoliques à chaînes longues sous forme d'acylcarnitine à travers la membrane mitochondriale interne afin que la  $\beta$ -oxydation génère de l'adénosine-triphosphate (ATP)<sup>123-125</sup>. Après altération de la fonction rénale, les taux de carnitine devraient donc être diminués sauf si les patients prennent des compléments alimentaires enrichis en carnitine ou dans le cas où les transporteurs de cations organiques ne sont pas altérés, car indépendant de la fonction de filtration rénale.

Le TMAO circulant augmente avec la sévérité des CKDs<sup>120,126</sup>. Cependant, l'ingestion de précurseurs (carnitine, TMA, choline), les différences génétiques dans l'activité des enzymes impliquées dans la production du TMAO (FMOs), et la composition spécifique du microbiote pourraient expliquer les différences intra- et interindividuelles observées dans les taux plasmatiques de celui-ci chez les patients insuffisants rénaux<sup>67,120,125</sup>. Bien que le TMAO circulant ait été identifié comme un facteur de risque de MCV, les mécanismes moléculaires pouvant expliquer la grande variation interindividuelle observée ne sont pas complètement définis. De récentes études ont mis en évidence différents types de transporteurs du TMAO, tels que le transporteur de cations organiques 2, situé au niveau de la membrane basolatérale des cellules du tubule rénal et pouvant moduler les taux de TMAO sanguin<sup>116</sup>. Des études complémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre les efflux du TMAO et déterminer si ces transporteurs pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques visant à réduire les niveaux de TMAO chez l'Homme. Le TMAO est également connu pour inhiber le transport inverse du cholestérol (RCT) et réguler positivement les récepteurs des macrophages conduisant à la formation de cellules spumeuses<sup>9,71</sup>. Le TMAO serait également impliqué dans la synthèse et le transport des acides biliaires ainsi que dans le métabolisme des stérols, ce qui suggère que son impact sur la pathogenèse des MCVs pourrait être multifactoriel<sup>71,127</sup>. Outre son association avec le risque de MCV, les taux de TMAO circulant ont été identifiés comme marqueurs pronostiques

de la mortalité chez les patients CKD en lien avec à la fibrose et le dysfonctionnement rénal<sup>59,116,128</sup>. Nos résultats sont en accord avec la littérature, et font l'objet d'un article qui a été soumis dans le journal *Toxins*, le 27 Septembre 2019.

Chez les patients atteints d'obésité morbide, nous avons montré que les taux circulants en TMAO augmentaient après chirurgie bariatrique tandis que celle-ci résorbait différents paramètres clés du syndrome métabolique, en accord avec la littérature<sup>129</sup>. Les fluctuations des métabolites associés au TMAO, tels que la choline et la carnitine, ont montré une diminution significative après chirurgie bariatrique comme décrit dans la littérature<sup>129</sup>. La choline et la carnitine interviennent dans plusieurs voies métaboliques de différents tissus dont le foie. La chirurgie bariatrique diminue significativement la choline sérique dès 6 mois après intervention chirurgicale, ce qui favoriserait sa disponibilité pour les autres voies métaboliques et suggèrerait que les voies métaboliques associées à la choline, autres que celle du TMAO, seraient altérées par l'obésité et résorbées après chirurgie bariatrique. La diminution de la carnitine pourrait s'expliquer de la même manière. Cependant, l'amélioration de cette voie est plus lente car significative seulement après 12 mois de chirurgie. La carnitine ne corrélant pas avec l'IMC et intervenant dans le transport des acides gras du cytosol vers les mitochondries, nos résultats confirment que ce métabolite est probablement pris en charge par d'autres voies métaboliques tel que la  $\beta$ -oxydation et n'est pas spécifiquement lié à l'obésité. Son association positive avec les paramètres hépatiques est plus surprenante. En effet, nos résultats suggèrent que des taux élevés en carnitine seraient associés à une dégradation de la fonction hépatique alors que la carnitine est connue pour être essentielle à l'oxydation des acides gras mitochondriaux, et impliquée dans le développement du cœur et du muscle squelettique par le catabolisme des lipides et en tant que facteur de croissance<sup>63</sup>. L'association positive entre la carnitine et les enzymes hépatiques reste donc surprenante et mériterait des analyses complémentaires pour une meilleure compréhension.

L'augmentation des taux circulants en TMAO après chirurgie bariatrique suscite quelques questionnements quant aux effets bénéfiques de ce traitement chirurgical au regard de l'importance du TMAO dans les MCVs. Il est connu que le régime alimentaire des patients et la composition du microbiote intestinal sont directement liés à la production de TMAO<sup>130</sup>. La chirurgie bariatrique entraîne un changement du régime alimentaire des patients et peut générer des changements de la composition du microbiote intestinal à cause de la restriction alimentaire ou de la malabsorption des nutriments. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent encore mal connus à ce jour. Il a été décrit que les FMOs (FMO1 et FMO3), permettant la formation du

TMAO à partir de la TMA produite par le microbiote intestinal, joueraient un rôle dans le stress du réticulum endoplasmique (RE) par l'intermédiaire même du TMAO, connu comme osmolyte cellulaire ayant des propriétés de chaperon chimique<sup>131,132</sup>. Les chaperons chimiques sont des petites molécules qui protègent les protéines de la dénaturation et influencent le repliement des protéines cellulaires<sup>133</sup>. Bien que le rôle des FMOs dans la modulation du stress du RE reste à déterminer, des études récentes chez l'animal suggèrent que l'augmentation de l'expression de la FMO3 serait liée aux effets bénéfiques de la restriction calorique chez les rongeurs<sup>134</sup>. Le TMAO serait utilisé en tant que chaperon chimique pour améliorer le repliement des protéines et réduire le stress du RE<sup>135</sup>, associé à une résistance à l'insuline<sup>136</sup>. Il a ainsi été montré que le TMAO diminue la résistance à l'insuline dans des hépatocytes traités aux lipides<sup>137</sup>. Ces données sont cohérentes avec un effet protecteur de la FMO3 contre le stress du RE, éventuellement *via* la génération de TMAO<sup>131</sup>, et pourraient expliquer en partie l'augmentation de TMAO que nous observons chez les patients obèses après chirurgie bariatrique. Par ailleurs, la chirurgie bariatrique rétablit la sensibilité à la leptine (hormone contrôlant la prise alimentaire et le poids) des cellules du cerveau, phénomène régulé par le soulagement du stress du RE et donc par une action du TMAO<sup>138</sup>. Cependant, des travaux complémentaires seront nécessaires pour vérifier si ces résultats obtenus chez l'animal peuvent être traduits chez l'homme.

Chez les patients DT2, la relation entre le TMAO et les événements CV majeurs, ou MACEs, présente un grand intérêt. En effet, elle met en lumière le rôle de la dysbiose métabolique sous-jacente au DT2 sur le risque CV. Notre étude a révélé que les concentrations plasmatiques de TMAO, et dans une moindre mesure celles de la bétaine et de la choline, étaient significativement augmentées chez les patients ayant présenté des MACEs. Par ailleurs, les concentrations plasmatiques de choline et de carnitine étaient corrélées positivement aux concentrations de TMAO dans notre étude, conformément aux voies métaboliques menant au TMAO. L'impact du diabète n'a pas été spécifiquement examiné, car tous les participants étaient touchés par le DT2, ce qui nous a amené à analyser la relation entre le TMAO et les MACEs chez ces patients à haut risque CV. Cependant, il est intéressant de noter que les concentrations plasmatiques moyennes de TMAO étaient plus élevées dans notre étude que dans les rapports précédemment établis sur des populations générales non diabétiques<sup>139</sup>. L'augmentation des concentrations en TMAO était aussi marquée chez les sous-populations non-obèses et obèses de notre cohorte, mais sans aucun impact de l'obésité sur les concentrations moyennes en TMAO. En revanche, les concentrations plasmatiques en TMAO corrélaient fortement avec l'eGFR des



patients et étaient donc dépendantes de l'insuffisance rénale. En effet, nous avons montré que les concentrations plasmatiques en TMAO étaient plus importantes dans la sous-population d'insuffisants rénaux, mais que ces concentrations demeuraient plus élevées pour les cas de MACE quel que soit le statut de la fonction rénale des patients. Nous confirmons ainsi les données de la littérature ayant décrit à plusieurs reprises que le TMAO était associé aux CKD et aux risques de MCVs<sup>58,59</sup>. Après ajustements multiparamétriques, les patients du quatrième quartile Q4 (concentrations plasmatiques comprises entre 15,1 et 284,4  $\mu\text{M}$ ) présentaient un risque CV 30% plus élevé (HR : 1,32 [1,02-1,70],  $p = 0,0325$ ) que celui des autres patients Q1-Q3 (concentrations plasmatiques comprises entre 0,01 et 15,1  $\mu\text{M}$ ). Le TMAO est donc un acteur supplémentaire dans les marqueurs biologiques des patients DT2 associés aux MCVs. Enfin, cette étude soulève des questions intéressantes sur la gestion des concentrations plasmatiques en TMAO, notamment *via* la nutrition, l'objectif ultime étant de réduire les paramètres CV. Cette dernière question fera sûrement l'objet d'essais cliniques adéquats dans un avenir proche.

Nos études ont également montré que l'ADMA est associée aux CKD tout comme la NMMA, la citrulline et la SDMA. Cependant, la méthylation de l'arginine (intra-cellulaire) ne se trouve pas altérée par l'insuffisance rénale, ce qui suggère que les fluctuations observées pour ces métabolites seraient bien liées à leur élimination rénale et non leur production au sein de la cellule. La citrulline est un métabolite connu comme intervenant dans plusieurs voies métaboliques comme le cycle de l'urée, entre autres, ou comme source endogène de l'arginine au niveau du rein<sup>140,141</sup>. Ceci expliquerait l'augmentation des concentrations plasmatiques en citrulline avec l'insuffisance rénale car celle-ci ne serait plus transformée en arginine par le rein. Pour la NMMA, s'agissant du précurseur de l'ADMA et de la SDMA, il est normal de retrouver des résultats similaires. En revanche, l'arginine ne semble pas être modulée par l'insuffisance rénale, probablement parce qu'elle intervient dans d'autres voies métaboliques. Le rein joue un rôle central dans le métabolisme de l'ADMA. Contrairement à la SDMA, seulement 20% de l'ADMA est excrété par l'urine. La majeure partie de l'ADMA est en effet transformée en citrulline par catabolisme enzymatique *via* la diméthylarginine diméthylaminohydrolase-1 (DDAH) et la DDAH-2, toutes deux exprimées dans le tissu rénal<sup>142</sup>, ou en acide diméthylguanidine *via* l'alanine-glyoxylate aminotransférase 2 (AGXT2). Ainsi, des taux élevés d'ADMA dans la circulation serait le résultat combiné d'une altération de la fonction rénale et de l'activité catabolique de l'ADMA par les DDAHs. Aujourd'hui, l'ADMA est considérée comme une toxine urémique contribuant au développement des MCVs chez les patients atteints de

néphropathie<sup>143</sup>. Les patients atteints d'insuffisance rénale polykystique, mais dont la fonction rénale est normale, présentent un dysfonctionnement endothélial et une activité diminuée de la NO synthase, l'ADMA étant connue comme étant un inhibiteur compétitif endogène de la voie de la NO synthase endothéliale (eNOS). De manière concomitante, la concentration plasmatique en ADMA augmente avec le stress oxydatif<sup>144</sup>. En raison de ses effets et de son augmentation précoce au cours de la néphropathie, l'ADMA serait probablement un facteur de progression de la maladie. Ainsi nous confirmons la littérature avec nos résultats qui montrent une augmentation de l'ADMA en fonction de l'insuffisance rénale en association avec les concentrations de NMMA, de SDMA et de citrulline conformément aux voies métaboliques menant à la formation d'ADMA.

L'ADMA s'est également révélée être un bon marqueur de d'obésité associé aux paramètres lipidiques, hépatiques mais aussi à la résistance à l'insuline. Par ailleurs, l'arginine et la NMMA, qui se trouvaient également corrélées avec ces mêmes paramètres, seraient probablement de bons marqueurs de risques CV. En effet, nos résultats ont montré que les concentrations en ADMA, mais également en arginine et en NMMA, corrélaient positivement avec l'IMC des patients. Ainsi, plus les patients étaient obèses et plus les concentrations sériques en ADMA augmentaient et celles-ci étaient fortement diminuées après chirurgie bariatrique. Le traitement chirurgical améliore le syndrome métabolique et a un impact direct sur les concentrations sériques en ADMA. Il diminue les risques de MCV en tant que principal traitement efficace de l'obésité morbide capable de résorber le syndrome métabolique et le risque de développer un DT2<sup>53,145,146</sup>. De plus, l'absence de fluctuations observées pour la SDMA et la citrulline après traitement chirurgical confirmerait que la SDMA est principalement éliminée par le rein et que la citrulline interviendrait principalement dans d'autres voies métaboliques. Comme précisé précédemment, la citrulline est connue comme source endogène d'arginine au niveau rénal, et intervient dans la voie d'élimination de l'azote excédentaire et de l'ammoniac neurotoxique (l'urogénèse) par formation d'urée<sup>147,148</sup>. C'est probablement pourquoi ces deux métabolites ne sont pas directement impactés par l'obésité et le traitement chirurgical.

Nous avons également confirmé la littérature avec les résultats de la cohorte SURDIAGENE. En effet, nous avons constaté que les concentrations en ADMA augmentaient avec les MACEs indépendamment de l'obésité et de l'insuffisance rénale. Cependant lorsque les patients sont randomisés en fonction de leur obésité (type I à obésité morbide) ou de leurs stades d'insuffisance rénale (de 1 à 5), nous avons constaté qu'au sein de chaque groupe il y avait une

augmentation des concentrations en ADMA chez les patients ayant présenté des évènements CV majeurs. La mesure de la méthylation de l'arginine a appuyé nos résultats et a confirmé la littérature, car celle-ci augmentait en fonction des MACEs. L'arginine est un acide aminé semi-essentiel qui joue un rôle métabolique et nutritionnel fondamental dans le cadre du maintien de l'homéostasie azotée. En particulier, l'arginine est le précurseur du NO qui est impliqué dans la fonction endothéliale<sup>78</sup>. Dans le cas du DT2, mais aussi de l'hypercholestérolémie ou de l'hypertension, la disponibilité du NO est diminuée, soulignant que le niveau d'activité de la eNOS joue un rôle dans l'athérosclérose<sup>19</sup>. Ici nous montrons une augmentation de la méthylation de l'arginine et donc de la synthèse de l'ADMA chez les patients DT2. L'ADMA est un inhibiteur compétitif endogène de eNOS, qui diminue donc la vasodilatation des vaisseaux sanguins et des artères<sup>149,150</sup>. Notre étude montre ainsi le rôle important de l'ADMA dans les évènements CV et son rôle en tant que marqueur du risque de MCV chez les patients à risque élevés. Les analyses statistiques multivariées sont actuellement en cours au CHU de Poitiers.

L'ensemble de ces résultats ont montré que le TMAO et l'ADMA étaient des marqueurs associés aux évènements CV majeurs. Ces marqueurs pourraient également jouer un rôle important dans le diagnostic précoce de l'insuffisance rénale (TMAO, SDMA) et de MCV (TMAO et ADMA) chez les patients DT2. Cependant, certaines informations seraient utiles pour compléter les résultats des dosages de ces marqueurs, notamment au sein des insuffisants rénaux dont nous n'avons pu réaliser le dosage urinaire pour l'ensemble des patients. Chez les patients obèses, l'étude de la flore intestinale par méta-génomique<sup>151</sup> (dans les fèces) pourrait apporter plus d'informations sur la composition florale avant/après chirurgie bariatrique, et ainsi apporter des compléments d'information afin d'expliquer l'augmentation du TMAO qui peut être soit induite par une augmentation de l'activité enzymatiques hépatique, ou par une augmentation de la production de TMA par le microbiote intestinal<sup>152</sup>. Des études chez l'animal pourraient être menées afin d'étudier plus précisément le microbiote intestinal. Dans l'étude longitudinale des patients DT2 ayant présenté ou non des évènements CV majeurs et/ou une insuffisance rénale (SURDIAGENE), l'analyse des marqueurs dans les urines pourrait apporter des informations complémentaires importantes afin de mieux visualiser leurs modulations *via* la mesure de leur clairance, et d'avoir une vision plus large de leurs métabolismes dans le cas des MACEs. L'ajout de contrôles sains non diabétiques pourrait être également intégré à l'étude afin de comparer les niveaux de base des marqueurs avant le syndrome métabolique sous-jacent au DT2.

Il est également important de noter que ces marqueurs sont à évaluer indépendamment les uns des autres en fonction des maladies ou syndromes métaboliques rencontrés. Dans le cas du TMAO, nous avons montré qu'il pouvait intervenir dans plusieurs voies métaboliques mais pouvait aussi être régulé par différents intermédiaires comme le régime alimentaire, le microbiote intestinal ou encore les enzymes hépatiques. Nos résultats ont ouvert de nouvelles hypothèses qui devront être investiguées par d'autres études, nécessaires à la compréhension des mécanismes sous-jacents au TMAO et son importance dans les MCVs (association avec le stress du RE, rôle dans le transport inverse du cholestérol). Par ailleurs, l'ADMA s'est avérée être un bon marqueur des MCVs dans le cas du DT2, associée aux dyslipidémies, mais également associée aux CKD.

En perspective, nous souhaitons étudier le TMAO dans une cohorte asiatique de patients DT2 (n = 2064). Ces patients ont un régime alimentaire différent des occidentaux et riche en poisson (TMA). Nous pourrions ainsi déterminer les effets du régime alimentaire sur la production du TMAO. Une étude plus approfondie de la composition du microbiote intestinal pourrait-être envisagée afin de mieux comprendre la synthèse du TMA et la régulation de la formation de TMAO par l'inhibition de la synthèse de TMA. Des études complémentaires pourront-être également réalisées sur les enzymes hépatiques et leur impact sur le stress du RE en relation avec une augmentation du TMAO dans le cas des chirurgies bariatriques. Cela pourrait-être envisagé à partir de cellules hépatiques afin de mieux comprendre les modulations du TMAO, et évaluer si ces modulations seraient délétères pour le patient (risque CV) ou plus en faveur de l'inhibition du stress du RE. Il a également été montré dans la littérature qu'il existe des souches de bactéries (*Archaea*) capables d'épuiser la TMA produite par d'autres souches en la réduisant pour la méthanogénèse<sup>153</sup>. Ainsi, l'étude de traitement par « Archaeobiotics » pourrait être envisagée chez des patients à risque CV élevé. En ce qui concerne l'ADMA, les études présentées dans ce projet de recherche ont montré son importance dans les MCVs et dans leur prédiction. Il pourrait être intéressant d'étudier les modulations de l'ADMA dans le cas de patients sains vs obèses non diabétiques puis de comparer les résultats à ceux obtenus avec la cohorte SURDIAGENE. Ceci permettrait de mieux stratifier les modulations de l'ADMA et de la méthylation de l'arginine. Des études de ces marqueurs et de leurs métabolites chez d'autres patients atteints d'autres maladies à haut risque de MCVs, telles que l'hypertension artérielle, ou sous environnements délétères (tabac, inactivité physique) pourraient apporter des informations complémentaires sur le pouvoir prédictif du TMAO et de l'ADMA dans le risque CV et renforcer les données que nous connaissons de ces molécules.

## VII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rhee, E. P. & Gerszten, R. E. Metabolomics and Cardiovascular Biomarker Discovery. *Clinical Chemistry* **58**, 139–147 (2012).
2. Van Camp, G. Cardiovascular disease prevention. *Acta Clin Belg* **69**, 407–411 (2014).
3. Giavarina, D., Barzon, E., Cigolini, M., Mezzena, G. & Soffiati, G. Comparison of methods to identify individuals at increased risk of cardiovascular disease in Italian cohorts. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **17**, 311–318 (2007).
4. Nishida, C., Uauy, R., Kumanyika, S. & Shetty, P. The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutr* **7**, 245–250 (2004).
5. Kannel, W. B. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: Insights from the Framingham Study. *American Heart Journal* **110**, 1100–1107 (1985).
6. Hamada, S. & Gulliford, M. C. Multiple risk factor control, mortality and cardiovascular events in type 2 diabetes and chronic kidney disease: a population-based cohort study. *BMJ Open* **8**, e019950 (2018).
7. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **67**, 328–357 (2018).
8. Rinella, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* **313**, 2263–2273 (2015).
9. Wang, Z. *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **472**, 57–63 (2011).
10. Wang, Z., Tang, W. H. W., Cho, L., Brennan, D. M. & Hazen, S. L. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks: potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1383–1391 (2009).
11. Mann, J. F., Gerstein, H. C., Pogue, J., Bosch, J. & Yusuf, S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **134**, 629–636 (2001).
12. Blanchard, C. *et al.* Roux-en-Y gastric bypass reduces plasma cholesterol in diet-induced obese mice by affecting trans-intestinal cholesterol excretion and intestinal cholesterol absorption. *Int J Obes (Lond)* **42**, 552–560 (2018).
13. Jokinen, E. Obesity and cardiovascular disease. *Minerva Pediatr.* **67**, 25–32 (2015).
14. Rawshani, A. *et al.* Risk Factors, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **379**, 633–644 (2018).
15. Leong Darryl P. *et al.* Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 2. *Circulation Research* **121**, 695–710 (2017).
16. Yu, E. *et al.* Plasma Arginine/Asymmetric Dimethylarginine Ratio and Incidence of Cardiovascular Events: A Case-Cohort Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **102**, 1879–1888 (2017).

17. Münzel, T., Gori, T., Keaney, J. F., Maack, C. & Daiber, A. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur. Heart J.* **36**, 2555–2564 (2015).
18. Lim, S. S. *et al.* A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2224–2260 (2012).
19. Daiber, A. *et al.* New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
20. Münzel, T. *et al.* Effects of gaseous and solid constituents of air pollution on endothelial function. *Eur. Heart J.* **39**, 3543–3550 (2018).
21. Münzel, T. *et al.* Environmental Noise and the Cardiovascular System. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 688–697 (2018).
22. Rosengren, A. *et al.* Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364**, 953–962 (2004).
23. Yusuf, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364**, 937–952 (2004).
24. Zhang, H. *et al.* Artery interposed to vein did not develop atherosclerosis and underwent atrophic remodeling in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* **177**, 37–41 (2004).
25. Choi Byoung Geol *et al.* Association of Major Adverse Cardiac Events up to 5 Years in Patients With Chest Pain Without Significant Coronary Artery Disease in the Korean Population. *Journal of the American Heart Association* **8**, e010541 (2019).
26. null null *et al.* ACC/AHA 2002 Guideline Update for the Management of Patients With Chronic Stable Angina—Summary Article. *Circulation* **107**, 149–158 (2003).
27. Yasue, H., Nakagawa, H., Itoh, T., Harada, E. & Mizuno, Y. Coronary artery spasm--clinical features, diagnosis, pathogenesis, and treatment. *J Cardiol* **51**, 2–17 (2008).
28. Nam, P. *et al.* The impact of myocardial bridge on coronary artery spasm and long-term clinical outcomes in patients without significant atherosclerotic stenosis. *Atherosclerosis* **270**, 8–12 (2018).
29. Choi, B. G. *et al.* Three-year follow-up of patients with acetylcholine-induced coronary artery spasm combined with insignificant coronary stenosis. *Int. J. Cardiol.* **238**, 66–71 (2017).
30. Ong Peter *et al.* Clinical Usefulness, Angiographic Characteristics, and Safety Evaluation of Intracoronary Acetylcholine Provocation Testing Among 921 Consecutive White Patients With Unobstructed Coronary Arteries. *Circulation* **129**, 1723–1730 (2014).
31. Lassalle, M., Ayav, C., Frimat, L., Jacquelinet, C. & Couchoud, C. The essential of 2012 results from the French Renal Epidemiology and Information Network (REIN) ESRD registry. *Néphrologie & Thérapeutique* **11**, 78–87 (2015).
32. The Emerging Risk Factors Collaboration. Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. *New England Journal of Medicine* **364**, 829–841 (2011).
33. Sun, D. *et al.* Type 2 Diabetes and Hypertension: A Study on Bidirectional Causality. *Circ. Res.* (2019) doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.314487.

34. Roussel, R., Steg, P. G., Mohammedi, K., Marre, M. & Potier, L. Prevention of cardiovascular disease through reduction of glycaemic exposure in type 2 diabetes: A perspective on glucose-lowering interventions. *Diabetes Obes Metab* **20**, 238–244 (2018).
35. Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J. D. & Wentworth, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* **16**, 434–444 (1993).
36. al, M. C., et. Chronic kidney disease and risk of incident myocardial infarction and all-cause and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women f... - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chronic+kidney+disease+and+risk+of+incident+myocardial+infarction+and+all-cause+and+cardiovascular+disease+mortality+in+middle-aged+men+and+women+from+the+general+population>.
37. Levey, A. S. *et al.* National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann. Intern. Med.* **139**, 137–147 (2003).
38. National High Blood Pressure Education Program. *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.* (National Heart, Lung, and Blood Institute (US), 2004).
39. Hakeem, A. *et al.* Renal function and risk stratification of diabetic and nondiabetic patients undergoing evaluation for coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Imaging* **3**, 734–745 (2010).
40. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* **39**, S1-266 (2002).
41. Coresh, J., Astor, B. C., Greene, T., Eknoyan, G. & Levey, A. S. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am. J. Kidney Dis.* **41**, 1–12 (2003).
42. Murphy, D. *et al.* Trends in prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Ann Intern Med* **165**, 473–481 (2016).
43. Halimi, J.-M. The emerging concept of chronic kidney disease without clinical proteinuria in diabetic patients. *Diabetes & Metabolism* **38**, 291–297 (2012).
44. Weil, E. J. *et al.* Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney International* **82**, 1010–1017 (2012).
45. Hales, C. M. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2015–2016. 8 (2017).
46. Cadenas-Sanchez, C. *et al.* Prevalence of overweight/obesity and fitness level in preschool children from the north compared with the south of Europe: an exploration with two countries. *Pediatric Obesity* **11**, 403–410 (2016).
47. Sanghera, D. K., Bejar, C., Sharma, S., Gupta, R. & Blackett, P. R. Obesity Genetics and Cardiometabolic Health: Potential for Risk Prediction. *Diabetes Obes Metab* (2019) doi:10.1111/dom.13641.
48. Mandviwala, T., Khalid, U. & Deswal, A. Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? *Curr Atheroscler Rep* **18**, 21 (2016).

49. Poirier, P. & Després, J.-P. Obésité et maladies cardiovasculaires. *Med Sci (Paris)* **19**, 943–949 (2003).
50. Kris-Etherton Penny, Eckel Robert H., Howard Barbara V., St. Jeor Sachiko & Bazzarre Terry L. Lyon Diet Heart Study. *Circulation* **103**, 1823–1825 (2001).
51. Parikh, R. M. & Mohan, V. Changing definitions of metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab* **16**, 7–12 (2012).
52. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497 (2001).
53. Buchwald, H. The Evolution of Metabolic/Bariatric Surgery. *OBES SURG* **24**, 1126–1135 (2014).
54. Prise en charge chirurgicale de l'obésité chez l'adulte : les différentes techniques. *Haute Autorité de Santé* [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_866117/fr/prise-en-charge-chirurgicale-de-l-obesite-chez-l-adulte-les-differentes-techniques](https://www.has-sante.fr/jcms/c_866117/fr/prise-en-charge-chirurgicale-de-l-obesite-chez-l-adulte-les-differentes-techniques).
55. Blanchard, C. *et al.* Roux-en-Y gastric bypass reduces plasma cholesterol in diet-induced obese mice by affecting trans-intestinal cholesterol excretion and intestinal cholesterol absorption. *Int J Obes (Lond)* **42**, 552–560 (2018).
56. Karlsson, F. H. *et al.* Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature Communications* **3**, (2012).
57. Li, X. S. *et al.* Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide in acute coronary syndromes: a prognostic marker for incident cardiovascular events beyond traditional risk factors. *European Heart Journal* ehw582 (2017) doi:10.1093/eurheartj/ehw582.
58. Zeisel, S. H. & Warrier, M. Trimethylamine N -Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. *Annual Review of Nutrition* **37**, 157–181 (2017).
59. Tang, W. H. W. *et al.* Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* **368**, 1575–1584 (2013).
60. Janeiro, M. H., Ramírez, M. J., Milagro, F. I., Martínez, J. A. & Solas, M. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. *Nutrients* **10**, (2018).
61. Fennema, D., Phillips, I. R. & Shephard, E. A. Trimethylamine and Trimethylamine N-Oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-Mediated Host-Microbiome Metabolic Axis Implicated in Health and Disease. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 1839–1850 (2016).
62. Zhu, Y. *et al.* Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 4268–4273 (2014).
63. Longo, N., Frigeni, M. & Pasquali, M. CARNITINE TRANSPORT AND FATTY ACID OXIDATION. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 2422–2435 (2016).
64. Chen, Y., Patel, N. A., Crombie, A., Scrivens, J. H. & Murrell, J. C. Bacterial flavin-containing monooxygenase is trimethylamine monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 17791–17796 (2011).



65. Chhibber-Goel, J. *et al.* The complex metabolism of trimethylamine in humans: endogenous and exogenous sources. *Expert Rev Mol Med* **18**, e8 (2016).
66. Bennett, B. J. *et al.* Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metab.* **17**, 49–60 (2013).
67. Esposito, T., Varriale, B., D'Angelo, R., Amato, A. & Sidoti, A. Regulation of flavin-containing mono-oxygenase (Fmo3) gene expression by steroids in mice and humans. *Horm Mol Biol Clin Investig* **20**, 99–109 (2014).
68. Wang, Z. *et al.* Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur. Heart J.* **35**, 904–910 (2014).
69. Canyelles, M. *et al.* Trimethylamine N-Oxide: A Link among Diet, Gut Microbiota, Gene Regulation of Liver and Intestine Cholesterol Homeostasis and HDL Function. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
70. Charach, G., Rabinovich, A., Argov, O., Weintraub, M. & Rabinovich, P. The role of bile Acid excretion in atherosclerotic coronary artery disease. *Int J Vasc Med* **2012**, 949672 (2012).
71. Koeth, R. A. *et al.* Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* **19**, 576–585 (2013).
72. Makishima, M. *et al.* Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **284**, 1362–1365 (1999).
73. Hov, G. G., Aasarød, K. I., Sagen, E. & Åsberg, A. Arginine, dimethylated arginine and homoarginine in relation to cardiovascular risk in patients with moderate chronic kidney disease. *Clinical Biochemistry* **48**, 646–651 (2015).
74. Moncada, S. & Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002–2012 (1993).
75. Di Gangi, I. M. *et al.* Simultaneous quantitative determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **677**, 140–148 (2010).
76. Tsikas, D., Bollenbach, A., Hanff, E. & Kayacelebi, A. A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and homoarginine (hArg): the ADMA, SDMA and hArg paradoxes. *Cardiovascular Diabetology* **17**, (2018).
77. Rysz, J., Gluba-Brzózka, A., Franczyk, B., Jabłonowski, Z. & Ciałkowska-Rysz, A. Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
78. Rasmusen, C., Cynober, L. & Couderc, R. Arginine et statines : relation avec le métabolisme du monoxyde d'azote et perspectives dans le traitement de l'athérosclérose. *Annales de Biologie Clinique* **63**, 443–455 (2005).
79. Böger, R. H. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, 1467–1472 (2003).
80. Wilcken, D. E. L., Sim, A. S., Wang, J. & Wang, X. L. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism* **91**, 309–317 (2007).

81. Vallance Patrick & Leiper James. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine:Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 1023–1030 (2004).
82. Teerlink, T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* **10**, S73–S81 (2005).
83. Plumb, R. *et al.* Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 2331–2337 (2004).
84. Nawrocki, J., Dunlap, C., McCormick, A. & Carr, P. W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J Chromatogr A* **1028**, 1–30 (2004).
85. Johnson, A. R. & Vitha, M. F. Chromatographic selectivity triangles. *Journal of Chromatography A* **1218**, 556–586 (2011).
86. Poole, C. F. & Lenca, N. Applications of the solvation parameter model in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1486**, 2–19 (2017).
87. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Glajch, J. L. *Practical HPLC Method Development*. (John Wiley & Sons, 2012).
88. McCalley, D. V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1523**, 49–71 (2017).
89. Alpert, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* **499**, 177–196 (1990).
90. Buszewski, B. & Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* **402**, 231–247 (2012).
91. Subirats, X., Bosch, E. & Rosés, M. Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography XVIII: pH variation in mobile phases containing formic acid, piperazine, tris, boric acid or carbonate as buffering systems and acetonitrile as organic modifier. *J Chromatogr A* **1216**, 2491–2498 (2009).
92. Griffiths, W. J., Jonsson, A. P., Liu, S., Rai, D. K. & Wang, Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem. J.* **355**, 545–561 (2001).
93. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301 (1988).
94. Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451–4459 (1984).
95. Yamashita, M. & Fenn, J. B. Negative ion production with the electrospray ion source. *J. Phys. Chem.* **88**, 4671–4675 (1984).
96. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
97. Rostom, A. A. & Robinson, C. V. Detection of the Intact GroEL Chaperonin Assembly by Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4718–4719 (1999).
98. Tito, M. A., Tars, K., Valegard, K., Hajdu, J. & Robinson, C. V. Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry of the Intact MS2 Virus Capsid. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3550–3551 (2000).

99. Taylor Geoffrey Ingram. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **280**, 383–397 (1964).
100. Werner, E. Analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse : application à la recherche de biomarqueurs indirects d'induction enzymatique. (2011).
101. Campana, J. E. Elementary theory of the quadrupole mass filter. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **33**, 101–117 (1980).
102. Dubreuil, P. [http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/masse/Ms1/spectro\\_masse1.html](http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/masse/Ms1/spectro_masse1.html).
103. Hibou, V. Spectrométrie de masse en Tandem MS/MS» *Analytical Toxicology. Analytical Toxicology* <https://www.analyticaltoxicology.com/spectrometrie-de-masse-tandem-ms-ms/> (2017).
104. Hadjadj, S. *et al.* Prognostic value of the insertion/deletion polymorphism of the ACE gene in type 2 diabetic subjects: results from the Non-insulin-dependent Diabetes, Hypertension, Microalbuminuria or Proteinuria, Cardiovascular Events, and Ramipril (DIABHYCAR), Diabete de type 2, Néphropathie et Genetique (DIAB2NEPHROGENE), and Survie, Diabete de type 2 et Genetique (SURDIAGENE) studies. *Diabetes Care* **31**, 1847–1852 (2008).
105. Levey, A. S. *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* **150**, 604–612 (2009).
106. Khoury, P. E. *et al.* Plasma proprotein-convertase-subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and cardiovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **20**, 943–953 (2018).
107. Wyndham, K. D. *et al.* Characterization and evaluation of C18 HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles. *Anal. Chem.* **75**, 6781–6788 (2003).
108. Mi, S., Zhao, Y.-Y., Jacobs, R. L. & Curtis, J. M. Simultaneous determination of trimethylamine and trimethylamine N-oxide in mouse plasma samples by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **40**, 688–696 (2017).
109. Cook, N. R. & Paynter, N. P. Performance of Reclassification Statistics in Comparing Risk Prediction Models. *Biom J* **53**, 237–258 (2011).
110. Hayes, A. J., Leal, J., Gray, A. M., Holman, R. R. & Clarke, P. M. UKPDS outcomes model 2: a new version of a model to simulate lifetime health outcomes of patients with type 2 diabetes mellitus using data from the 30 year United Kingdom Prospective Diabetes Study: UKPDS 82. *Diabetologia* **56**, 1925–1933 (2013).
111. Saulnier, P.-J. *et al.* Association of Circulating Biomarkers (Adrenomedullin, TNFR1, and NT-proBNP) With Renal Function Decline in Patients With Type 2 Diabetes: A French Prospective Cohort. *Diabetes Care* dc161571 (2016) doi:10.2337/dc16-1571.
112. Kadar, H. *et al.* A multiplexed targeted assay for high-throughput quantitative analysis of serum methylamines by ultra performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* **597**, 12–20 (2016).

113. Kaza, M., Karaźniewicz-Łada, M., Kosicka, K., Siemiątkowska, A. & Rudzki, P. J. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **165**, 381–385 (2019).
114. Moein, M. M., El Beqqali, A. & Abdel-Rehim, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of Chromatography B* **1043**, 3–11 (2017).
115. Man, R. E. K. *et al.* The Association of Estimated Glomerular Filtration Rate With Diabetic Retinopathy and Macular Edema. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **56**, 4810 (2015).
116. Teft, W. A. *et al.* Identification and Characterization of Trimethylamine-N-oxide Uptake and Efflux Transporters. *Mol. Pharm.* **14**, 310–318 (2017).
117. Maraninchi, M. *et al.* Amélioration du profil lipidique après chirurgie bariatrique en relation avec une diminution des taux d'apolipoprotéine-CIII plasmatiques : redistribution entre lipoprotéines HDL et non-HDL. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **30**, 259–260 (2016).
118. Goh, G. B.-B., Schauer, P. R. & McCullough, A. J. Considerations for bariatric surgery in patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* **24**, 3112–3119 (2018).
119. Rennick, B., Acara, M., Hysert, P. & Mookerjee, B. Choline loss during hemodialysis: homeostatic control of plasma choline concentrations. *Kidney Int.* **10**, 329–335 (1976).
120. Fernandez-Prado, R. *et al.* Nutrients Turned into Toxins: Microbiota Modulation of Nutrient Properties in Chronic Kidney Disease. *Nutrients* **9**, (2017).
121. Mi, W., van Wijk, N., Cansev, M., Sijben, J. W. C. & Kamphuis, P. J. G. H. Nutritional approaches in the risk reduction and management of Alzheimer's disease. *Nutrition* **29**, 1080–1089 (2013).
122. Guertin, K. A. *et al.* Serum Trimethylamine N-oxide, Carnitine, Choline and Betaine in Relation to Colorectal Cancer Risk in the Alpha Tocopherol and Beta Carotene Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **26**, 945–952 (2017).
123. Guarnieri, G. Carnitine in maintenance hemodialysis patients. *J Ren Nutr* **25**, 169–175 (2015).
124. Steiber, A., Kerner, J. & Hoppel, C. L. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Mol. Aspects Med.* **25**, 455–473 (2004).
125. Sanchez-Niño, M. D. & Ortiz, A. Differential effects of oral and intravenous l-carnitine on serum lipids: is the microbiota the answer? *Clin Kidney J* **7**, 437–441 (2014).
126. Bain, M. A., Faull, R., Fornasini, G., Milne, R. W. & Evans, A. M. Accumulation of trimethylamine and trimethylamine- N -oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 1300–1304 (2006).
127. Wilson, A., McLean, C. & Kim, R. B. Trimethylamine-N-oxide: a link between the gut microbiome, bile acid metabolism, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **27**, 148–154 (2016).
128. Kim, R. B. *et al.* Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney Int.* **89**, 1144–1152 (2016).
129. Trøseid, M. *et al.* Major Increase in Microbiota-Dependent Proatherogenic Metabolite TMAO One Year After Bariatric Surgery. *Metab Syndr Relat Disord* **14**, 197–201 (2016).

130. Erickson, M. L. *et al.* Effects of Lifestyle Intervention on Plasma Trimethylamine N-Oxide in Obese Adults. *Nutrients* **11**, (2019).
131. Liao, B. M., McManus, S. A., Hughes, W. E. & Schmitz-Peiffer, C. Flavin-Containing Monooxygenase 3 Reduces Endoplasmic Reticulum Stress in Lipid-Treated Hepatocytes. *Mol Endocrinol* **30**, 417–428 (2016).
132. Spector, R. New Insight into the Dietary Cause of Atherosclerosis: Implications for Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **358**, 103–108 (2016).
133. Gault, J. *et al.* Mass Spectrometry Reveals the Direct Action of a Chemical Chaperone. *J. Phys. Chem. Lett.* **9**, 4082–4086 (2018).
134. Fu, Z. D. & Klaassen, C. D. Short-term calorie restriction feminizes the mRNA profiles of drug metabolizing enzymes and transporters in livers of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **274**, 137–146 (2014).
135. Welch, W. J. & Brown, C. R. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* **1**, 109–115 (1996).
136. Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **140**, 900–917 (2010).
137. Achard, C. S. & Laybutt, D. R. Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in liver cells results in two distinct outcomes: adaptation with enhanced insulin signaling or insulin resistance. *Endocrinology* **153**, 2164–2177 (2012).
138. Seyfried, F. & Hankir, M. K. Could de-stressing the brain be the solution for long-term weight loss? *Cell Stress* **3**, 29–37.
139. Heianza, Y., Ma, W., Manson, J. E., Rexrode, K. M. & Qi, L. Gut Microbiota Metabolites and Risk of Major Adverse Cardiovascular Disease Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *J Am Heart Assoc* **6**, (2017).
140. Castillo, L. *et al.* Plasma arginine and citrulline kinetics in adults given adequate and arginine-free diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7749–7753 (1993).
141. Allerton, T. D. *et al.* L-Citrulline Supplementation: Impact on Cardiometabolic Health. *Nutrients* **10**, (2018).
142. Palm, F., Onozato, M. L., Luo, Z. & Wilcox, C. S. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H3227-3245 (2007).
143. Mihout, F. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) induces chronic kidney disease through a mechanism involving collagen and TGF- $\beta$ 1 synthesis. *The Journal of Pathology* **223**, 37–45 (2011).
144. Wang, D. *et al.* Asymmetric dimethylarginine and lipid peroxidation products in early autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* **51**, 184–191 (2008).
145. Jahansouza, C. *et al.* Partitioning of Adipose Lipid Metabolism by Altered Expression and Function of PPAR Isoforms After Bariatric Surgery. *Int J Obes (Lond)* **42**, 139–146 (2018).
146. Cash, J. G. *et al.* Therapeutic reduction of lysophospholipids in the digestive tract recapitulates the metabolic benefits of bariatric surgery and promotes diabetes remission. *Molecular Metabolism* **16**, 55–64 (2018).

147. Luiking, Y. C., Ten Have, G. A. M., Wolfe, R. R. & Deutz, N. E. P. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E1177–E1189 (2012).
148. Patil, M., Bhaumik, J., Babykutty, S., Banerjee, U. & Fukumura, D. Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene* **35**, 4957–4972 (2016).
149. Morris, S. M. Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**, 45–51 (2004).
150. Gewaltig, M. T. & Kojda, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.* **55**, 250–260 (2002).
151. Borrel, G. *et al.* Genomics and metagenomics of trimethylamine-utilizing Archaea in the human gut microbiome. *ISME J* **11**, 2059–2074 (2017).
152. Romano, K. A., Vivas, E. I., Amador-Noguez, D. & Rey, F. E. Intestinal Microbiota Composition Modulates Choline Bioavailability from Diet and Accumulation of the Proatherogenic Metabolite Trimethylamine-N-Oxide. *mBio* **6**, (2015).
153. Brugère, J.-F. *et al.* Archaeobiotics. *Gut Microbes* **5**, 5–10 (2014).



**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**  
**SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

**Arginines méthylées et triméthylamines plasmatiques : de nouveaux marqueurs d'incidences cardiovasculaires chez les patients à risque élevé.**

AGUESSE Audrey  
Soutenance le 17/12/2019

**RÉSUMÉ**

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont l'une des principales causes de mortalité à travers le monde. Les pathologies chroniques sous-jacentes aux dérèglements métaboliques, telles que le diabète, la stéatose hépatique non alcoolique, l'obésité et l'insuffisance rénale, favorisent les complications cardiovasculaires. En revanche, les interactions entre ces pathologies et les événements cardiovasculaires restent mal comprises, et l'utilisation de nouveaux marqueurs pronostiques permettrait d'identifier les patients à haut risque pour une meilleure prise en charge. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux composés identifiés comme biomarqueurs des MCVs : la diméthylarginine asymétrique (ADMA) et le N-oxyde de triméthylamine (TMAO). Nous avons développé des méthodes d'analyses ciblées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour le dosage de l'ADMA, du TMAO et de leurs métabolites associés dans le plasma/sérum humain. Ces méthodes d'analyse ont ensuite été appliquées pour l'analyse de 3 cohortes de patients à haut risque cardiovasculaire : 1) des patients en insuffisance rénale (n = 99), 2) des patients obèses avant/après chirurgie bariatrique (n = 31), et 3) des patients diabétiques de type 2 (DT2, n = 1468, cohorte SURDIAGENE) suivis prospectivement durant 7 ans sur la survenue des événements cardiovasculaires majeurs (MACE). Les résultats ont montré que les méthodes d'analyses étaient répétables et reproductibles dans les conditions utilisées au laboratoire. Les 2 premières cohortes ont permis de confirmer que la TMAO était fortement associé à l'insuffisance rénale, ses concentrations plasmatiques étant inversement corrélées aux taux de filtration glomérulaire ( $r = -0,52$  ;  $p < 0,0001$ ). En revanche, les concentrations circulantes en ADMA étaient majoritairement associées au syndrome métabolique, caractérisé par des anomalies du métabolisme lipidique, et fortement diminuées après chirurgie bariatrique ( $-37\%$  ;  $p < 0,0001$ ). Ces 2 premières cohortes ont ainsi permis de révéler différents facteurs confondants à prendre en compte pour les analyses statistiques visant à déterminer le potentiel prédictif du TMAO et de l'ADMA dans la survenue des MACEs chez les patients DT2. Durant le suivi des patients SURDIAGENE, 403 MACEs ont été enregistrés. Quel que soit le statut rénal ou lipidique, les concentrations circulantes en TMAO et en ADMA étaient supérieures chez les patients atteints de MACEs ( $p < 0,0001$ ). Après analyses statistiques et ajustements multiparamétriques, le risque de développer un MACE était augmenté de 32% (HR : 1,32 [1,02-1,70] ;  $p = 0,0325$ ) pour les patients DT2 présentant les plus fortes concentrations plasmatiques en TMAO (quartile 4 : 15,1-284,4  $\mu\text{M}$  vs quartiles 1-3 : 0,01-15,1  $\mu\text{M}$ ). Ces analyses sont actuellement en cours pour l'ADMA. Nos résultats ont donc confirmé l'intérêt du dosage du TMAO et de l'ADMA comme marqueur du risque cardiovasculaire chez les patients DT2. De nouvelles hypothèses ont également été proposées en ce qui concerne le TMAO. Elles devront être investiguées par d'autres études pour une meilleure compréhension de son importance dans les MCVs.

**Mots-Clés** : Maladies cardiovasculaires, diméthylarginine asymétrique (ADMA), N-oxyde de triméthylamine (TMAO), biomarqueurs, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.