



**HAL**  
open science

# Évaluation fonctionnelle et structurale des HDL plasmatiques au cours des états inflammatoires

Sébastien Tanaka

► **To cite this version:**

Sébastien Tanaka. Évaluation fonctionnelle et structurale des HDL plasmatiques au cours des états inflammatoires. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion, 2019. Français. NNT : 2019LARE0032 . tel-02477471

**HAL Id: tel-02477471**

**<https://theses.hal.science/tel-02477471>**

Submitted on 13 Feb 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.

## Université de la Réunion

### Thèse

Présenté pour l'obtention du titre de Docteur en Science de l'Université de la Réunion

Spécialité : Biologie Médicale Santé

Par

**Sébastien TANAKA**

## **Evaluation fonctionnelle et structurale des HDL plasmatiques au cours des états inflammatoires**

Soutenance publique le 02 décembre 2019

Composition du Jury :

**Mme Muriel LAFFARGUE** : Directeur de Recherche (Toulouse), rapporteur

**M. Hafid AIT-OUFELLA** : PU-PH (Paris), rapporteur

**Mme Estelle NOBECOURT** : PU-PH (La Réunion), examinateur

**M. Philippe MONTRAVERS** : PU-PH (Paris), examinateur

**M. Olivier MEILHAC** : Directeur de Recherche (La Réunion), directeur de thèse



## Université de la Réunion

### Thèse

Présenté pour l'obtention du titre de Docteur en Science de l'Université de la Réunion

Spécialité : Biologie Médicale Santé

Par

**Sébastien TANAKA**

## **Evaluation fonctionnelle et structurale des HDL plasmatiques au cours des états inflammatoires**

Soutenance publique le 02 décembre 2019

Composition du Jury :

**Mme Muriel LAFFARGUE** : Directeur de Recherche (Toulouse), rapporteur

**M. Hafid AIT-OUFELLA** : PU-PH (Paris), rapporteur

**Mme Estelle NOBECOURT** : PU-PH (La Réunion), examinateur

**M. Philippe MONTRAVERS** : PU-PH (Paris), examinateur

**M. Olivier MEILHAC** : Directeur de Recherche (La Réunion), directeur de thèse





## Remerciements

Ce travail a été réalisé dans l'unité INSERM UMR1188 DÉTROI à Saint-Denis de la Réunion et au sein du département d'anesthésie-réanimation de l'hôpital Bichat à Paris. Une partie du travail a également été effectuée au sein du département d'anesthésie-réanimation de l'hôpital Bicêtre au Kremlin-Bicêtre.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères aux membres du jury :

A Madame le Docteur M. Laffargue pour avoir accepté et pris le temps de juger ce travail, malgré toutes vos obligations. Merci d'avoir accepté de vous rendre sur l'île de la Réunion, je suis très honoré de votre présence parmi les membres du jury.

A Monsieur le Professeur H. Ait-Oufella, pour avoir si aimablement accepté de faire partie de ce jury et d'avoir pris le temps de juger ce travail de thèse. Merci d'avoir accepté sans hésiter de vous rendre sur l'île de La Réunion malgré votre emploi du temps chargé.

A Monsieur le Professeur P. Montravers pour votre soutien depuis le début, pour vos compétences scientifiques, médicales et votre disponibilité. C'est un grand honneur de travailler à vos côtés dans votre service. Lorsque je vous ai parlé de ma volonté de faire cette thèse un peu particulière entre Paris et l'île de la Réunion, vous avez été tout de suite extrêmement motivé et très compréhensif. Merci également pour votre aide financière et pour m'avoir laissé du temps pour me consacrer à ce travail. Je suis très honoré de votre présence parmi ce jury.

A Madame le Professeur E. Nobecourt, pour avoir accepté si gentiment de faire partie de ce jury malgré toutes vos obligations. Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de ce jury.

Je souhaite témoigner mon plus profond respect et mes remerciements à mon directeur de thèse et ami le Dr Olivier Meilhac qui a été bien plus qu'un directeur durant ces années et que j'admire énormément. Merci pour tes compétences scientifiques, ta rigueur, tes idées innovantes que tu as toujours avant les autres. Merci également pour le temps passé à mes côtés alors que ton emploi du temps est digne d'un ministre. Merci pour ta capacité à toujours penser la science pour ses applications potentielles en médecine. Merci enfin pour ta grande générosité et ton humanité.

Je tiens également à remercier :

Le professeur J. Duranteau pour votre soutien indéfectible depuis de nombreuses années et de m'avoir toujours poussé à voir plus loin et plus haut. Je pense que sans votre coup de pouce, je ne me serais jamais lancé dans cette aventure.

J'adresse aussi tous mes remerciements :

- à tous les membres de l'unité DÉTROI, de l'unité PIMIT et du CYROI pour m'avoir supporté, formé et accompagné durant ma thèse.

En particulier je voulais remercier Jessica, Jennyfer et Cynthia pour m'avoir tant aidé et d'avoir été si réactives en cas d'urgence malgré la distance. Je vous en serai toujours reconnaissant.

Merci aussi à David et Mathieu pour votre aide. Vous vous rappellerez longtemps d'une certaine manip de l'hiver 2019.

Merci également à tous les doctorants et étudiants de master, Angélique, Janice, Stéphane, Bryan, Kevin, Eloïse, Valentin, Ali pour votre aide précieuse et votre bonne humeur au quotidien.

Merci aussi à Nicolas pour ta gentillesse, ton professionnalisme, ta bonne humeur et ton dynamisme !

Merci à Gilles, Christian, Christine, Philippe, Jean-Loup, Brice, Steeve, Wildriss, Zarouki, Manu et Pierre. Merci pour votre accueil plus que chaleureux dans l'unité.

- à mes amis de l'unité INSERM 1148 de l'hôpital Bichat et en particulier le Docteur Jean-Baptiste Michel pour sa gentillesse et son immense savoir scientifique. Merci à Sandrine, Liliane et Devy pour leur précieuse aide.

- à mes collègues et amis du département d'anesthésie-réanimation de l'hôpital Bichat, sans qui je n'aurais pas pu faire cette thèse. Merci à Dan, Nadine, Lauriane, Charazad de m'avoir soutenu et tant aidé. Un grand merci et un gros bisous à la team de la réa chir : Alexy, Snau, Ptashk, Bryce, Sylvain, Nathalie, Enora, Sonia mais aussi Mathieu, Claire, Mouna! Merci pour votre bonne humeur au quotidien. Merci d'avoir gardé la réanimation quand je partais à la Réunion. Merci aussi aux infirmiers, AS et kiné du service.



- à Donia et Jules, mes anciens internes qui ont bien grandi ! Promis Donia, nous allons publier Fettha, promis Jules, on va publier High-SEPS! Merci pour votre dynamisme et votre bonne humeur.

- à la team Bicêtre : Sophy, Anatole, Samy, Gaele, Christian, PEL et Bernard !

- à mes amis de toujours Nyko, Buddy, Guigui et Cucu! Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu depuis tant d'année.

- à mes amis Greg, Sonia, Berengère, Mathieu, Karibou, Jpeg, Bobby, Jamal, Mohamed, Antoine, Aurore, Emilie, Ilyess et Agathe, les Catrices, Guy, les Tahitiens, Régis et Camille, Pascal, Grodesmard, Claudine, Raymond, Alice, Kobi, et à tous ceux que j'ai dû oublier !

Je voulais enfin remercier ma famille :

- Merci à Ouarda et à Mokhtar pour votre soutien, votre gentillesse, votre générosité et votre grande humanité. Je suis très heureux d'être à vos côtés, en famille. Merci aussi de vous occuper si bien de Norma. Je suis très touché de votre présence sur l'île de la Réunion pour assister à la soutenance.

- Merci Julien et Féfé pour tout, votre bonne humeur et les petites blagounettes du Viaud !

- Merci Aurélia d'être ma petite sœur chérie, pour ton soutien indéfectible. Même si cela n'est pas toujours facile de se voir, je sais que tu es et seras toujours là pour moi en toutes circonstances. J'embrasse aussi Lionel et bien sûr Thomas qui grandit tellement vite !

- Merci Délou pour ton soutien. Merci pour ta générosité et ta gentillesse au quotidien. Tu es une personne remarquable. Je remercie également bien sûr Manu et Lya.

- Merci à Dominique et à François d'avoir été à mes côtés.

- Merci à Mamie Simonne avec deux n. Tu serais fière de moi. Je pense très souvent à toi.

- Un grand merci à mes parents sans qui je ne serais rien. Merci pour votre soutien sans faille au quotidien, merci pour vos conseils éclairés, votre dynamisme et votre bonne humeur. Merci aussi de si bien vous occuper de Norma. Je suis très honoré de votre présence le jour de la soutenance.

- Enfin, je garde le meilleur pour la fin...

- Merci Ipti pour ton amour, ton soutien au quotidien, ta gentillesse, ta générosité, ton humour, et ta bonne humeur. Sans toi, je n'aurais jamais pu faire cette thèse entre Paris et La Réunion, et je te remercie du fond du cœur pour les sacrifices que tu as dû faire pour cela. Tu es extraordinaire, je t'aime tellement.

- Bien sûr je ne peux terminer ces pages de remerciement sans embrasser ma petite Norma chérie qui éclaire notre vie depuis presque 2 ans. Partir à la Réunion sans toi me déchire à chaque fois, mais quel bonheur de te retrouver quand tu m'accueilles avec le doux son de « papa é ya ! ». Je t'aime ma zouina.



# Sommaire

Remerciements .....	05
Sommaire .....	10
Résumé .....	16
Liste des abréviations .....	17
Introduction .....	20
<b>A. Le sepsis</b> .....	21
<b>I. Introduction et définitions</b> .....	21
<b>II. Epidémiologie du sepsis</b> .....	24
II. a Incidence et prévalence .....	24
II. b Mortalité .....	26
<b>III. Physiopathologie</b> .....	26
III. a Inflammation .....	26
III. b Activation précoce de gènes .....	28
III. c Activation du complément .....	29
III. d Immunosuppression .....	30
III. e Dysfonction de la barrière endothéliale .....	31
III. f Coagulopathie .....	34
III. g Formation du caillot .....	35
<b>IV. Conséquences sur les organes</b> .....	36
IV. a Atteinte neurologique .....	36
IV. b Atteinte pulmonaire .....	36
IV. c Atteinte cardio-vasculaire .....	37
IV. d Atteinte rénale .....	37
IV. e Atteinte hématologique .....	38
IV. f Atteinte hépatique .....	38
<b>V. Prévention et biomarqueurs</b> .....	39
V. a Prévention.....	39
V. b Biomarqueurs .....	39
<b>VI. Prise en charge du sepsis</b> .....	40
VI. a Contrôle de la source infectieuse .....	40
VI. b Stabilisation de l'hémodynamique .....	42
VI. c Modulation de la réponse inflammatoire .....	43
VI. d La « sepsis team » .....	46
VI. e La qualité de vie des patients .....	46
<b>VII. Perspectives</b> .....	47
VII. a Modulation de la réponse au sepsis .....	47
VII. b Thérapies immuno-stimulatrices .....	48

<b>B. Les lipoprotéines de haute densité (HDL)</b> .....	51
<b>I. Structure des HDL</b> .....	51
<b>II. Métabolisme des HDL, catabolisme et transport inverse du cholestérol</b> .....	52
<b>III. Propriétés pléiotropes des HDL</b> .....	55
III. a Propriétés de liaison et de neutralisation du LPS et LTA .....	55
III. b Inhibition de l'expression des molécules d'adhésion .....	58
III. c Régulation de la réponse inflammatoire des macrophages .....	59
III. d Vasodilatation microvasculaire .....	60
III. e Effets antithrombotiques .....	60
III. f Propriétés anti-oxydantes .....	61
III. g Propriétés anti-apoptotiques .....	62
<b>IV. Modification des lipoprotéines au cours du sepsis</b> .....	63
<b>V. Fonction des HDL au cours des états inflammatoires</b> .....	66
<b>VI. Les HDL synthétiques dans les études expérimentales sur le sepsis</b> .....	69
<b>VII. Perfusion de peptides mimétiques ou rHDL au cours du sepsis chez l'homme ?</b> .....	70
<b>VIII. Conclusion</b> .....	73
<b>Résultats</b> .....	77
<b>Partie 1 : Comparaison des profils lipidiques de patients septiques et de patients polytraumatisés en réanimation : résultats de l'étude LIPIDO</b> .....	78
<b>I. Etat des connaissances</b> .....	78
<b>II. Méthodes</b> .....	79
II. a Méthodologie de l'étude et sélection des patients .....	79
II. b Recueil des données .....	79
II. c Analyse statistique .....	80
<b>III. Résultats</b> .....	81
III. a Profil lipidique chez les patients traumatisés et les patients septiques .....	81
III. b Profil lipidique et sévérité du sepsis .....	84
III. c Profil lipidique et devenir des patients .....	85
III. d Profil lipidique et espèces bactériennes .....	85
III. e Profil lipidique dans le sous-groupe de patients traumatisés .....	85
<b>IV. Discussion</b> .....	87
<b>Partie 2 : Modifications de taille des HDL au cours du choc septique. Résultats de l'étude LIPOSEP</b> .....	90
<b>I. Etat des connaissances</b> .....	90
<b>II. Méthodes</b> .....	91
II. a Patients .....	91
II. b Recueil des données .....	91
II. c Détermination des profils de HDL selon le système de mesure Quantimétrie Lipoprint .....	92

II. d Détermination des concentrations d'ApoA-I par méthode ELISA .....	92
II. e Méthode ELISA LPS Binding Protein .....	93
II. f Quantification de l'ADN libre circulant (cf-DNA) .....	93
II. g Détermination des cytokines par méthode ELISA .....	93
II. h Analyses statistiques .....	94
<b>III. Résultats</b> .....	95
III. a Les patients .....	95
III. b Profils lipidiques .....	98
III. c Analyse de la taille des particules de HDL par Lipoprint.....	99
<b>IV. Discussion</b> .....	103
<b>Partie 3 : Evolution des profils lipidiques au cours du temps chez des patients septiques hospitalisés en réanimation : Résultats de l'étude HIGH-SEPS</b> .....	106
<b>I. Etat des connaissances</b> .....	106
<b>II. Méthodes</b> .....	107
II. a Méthodologie de l'étude et sélection des patients .....	107
II. b Recueil des données .....	107
II. c Analyse statistique .....	108
<b>III. Résultats</b> .....	110
III. a Population .....	110
III. b Etiologie des sepsis et microbiologie .....	112
III. c Concentration des lipoprotéines au cours du temps .....	114
III. d Devenir des patients .....	120
III. e Lien entre la concentration des lipoprotéines et le devenir des patients .....	122
III. f Performance des lipoprotéines pour prédire la mortalité .....	124
III. g Analyse selon le type de sepsis .....	125
III. h Corrélation entre les concentrations de HDL antérieure et le devenir des patients .....	127
<b>IV. Discussion</b> .....	129
<b>Partie 4 : Modifications structurales des HDL au cours du sepsis: analyse protéomique</b> .....	134
<b>I. Introduction</b> .....	134
<b>II. Méthodes</b> .....	137
II. a Méthodologie de l'étude et sélection des patients .....	137
II. b Recueil des données .....	137
II. c Analyse protéomique .....	139
II. d Analyse statistique .....	141
<b>III. Résultats</b> .....	142
III. a Population .....	142
III. b Bilans lipidiques .....	143
III. c Analyse protéomique .....	145
III. d Corrélations entre les apolipoprotéines et HDL-C / LDL-C.....	148

III. e Corrélation avec les marqueurs de gravité dans le sous-groupe de patients septiques .....	149
<b>IV. Discussion</b> .....	151
<b>Partie 5 : Effets de l'administration de HDL reconstituées humaines dans des modèles murins de sepsis</b> .....	156
<b>I. Introduction</b> .....	156
<b>II. Matériels et méthodes</b> .....	157
II. a Animaux.....	157
II. b Modalités de sepsis .....	157
II. c Injection intrapéritonéale de bactéries (modèle IP) .....	158
II. d Modèle de pneumonie à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (modèle PA) .....	159
II. e Courbe de survie .....	160
II. f Analyse plasmatique et histologique .....	160
II. g Mesure du cf-DNA .....	161
II. h Mesures des cytokines et des marqueurs endothéliaux .....	162
II. i Extraction d'ARN et RT-qPCR en temps réel .....	162
II. j Analyse histologique du poumon .....	163
II. k Compte bactérien .....	164
II. l Marquage des bactéries à l'Indium 111 .....	165
II. m Analyse statistique .....	165
<b>III. Résultats</b> .....	166
III. a Effets de l'injection IV de CSL111 sur la survie dans le modèle de CLP .....	166
III. b Effets de l'injection IV de CSL111 sur la survie dans le modèle IP .....	166
III. c ADN circulant (cf-DNA) .....	168
III. d Cytokines plasmatiques et dans les LBA .....	169
III. e Quantification des marqueurs plasmatiques de l'inflammation et d'activation endothéliale .....	171
III. f Expression de l'ARNm pulmonaire d'IL6, TNF $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine .....	172
III. g Bactériémies .....	173
III. h Quantification bactérienne dans le foie, les poumons, la rate et les reins .....	173
III. i Evaluation histologique et immunodétection d'ApoA-I et de CD68 au niveau des poumons .....	176
III. j Marquage des bactéries à l'Indium 111 .....	183
<b>IV. Discussion</b> .....	184
<b>Discussion générale</b> .....	188
<b>Bibliographie</b> .....	196
<b>Annexe</b> .....	218

**Annexe 1** : Tanaka et al. Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit. *Annals of Intensive Care*. 2017

**Annexe 2** : Tanaka et al. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Annals of Intensive Care*. 2019

**Annexe 3** : Tanaka et al. Reconstituted High-Density Lipoprotein therapy improves survival in mouse models of sepsis. En revision dans *Anesthesiology*

**Annexe 4** : Tanaka et al. High-density lipoprotein during sepsis : from bench to bedside. Soumission dans la revue *Critical Care Medicine*





## Résumé

**Contexte** : la principale fonction des HDL est le transport inverse du cholestérol des tissus vers le foie leur conférant ainsi un rôle de protection cardio-vasculaire. Ces particules présentent également d'autres propriétés endothélioprotectrices avec en particulier des effets anti-inflammatoires, antioxydants, anti-apoptotiques, anti-infectieux ou encore anti-thrombotiques.

Au cours de certains états d'inflammation chronique, comme dans l'athérosclérose, il a été décrit des modifications de fonction et de structure des HDL pouvant ainsi entraîner des conséquences néfastes sur la morbi-mortalité.

L'objectif de cette thèse a été de s'intéresser aux modifications structurales et de concentration survenant dans un modèle d'inflammation aiguë exacerbée, le sepsis chez l'homme. De plus, nous avons testé les effets de l'injection d'HDL reconstituées humaines dans plusieurs modèles de sepsis expérimentaux.

**Résultats** : dans une première partie, en comparant deux états inflammatoires exacerbés, nous avons montré que la concentration plasmatique de HDL était effondrée chez des patients à la phase aiguë d'un sepsis alors qu'elle n'était pas modifiée chez des patients polytraumatisés.

Une seconde partie s'est attachée à comparer des patients en choc septique et des patients non-septiques de réanimation. Nous avons confirmé ces différences observées de concentration. De plus, les patients septiques avaient une majorité de particules de HDL de grande taille comparativement aux patients contrôles qui avaient davantage de particules fonctionnelles de petite taille.

Une étude de la cinétique de la concentration des HDL chez 205 patients septiques de réanimation a mis en évidence une diminution drastique à la phase aiguë puis une augmentation lors de la guérison clinique du patient sans retour aux concentrations basales observées avant l'hospitalisation. La concentration de HDL était associée à certains critères de morbidité (score SOFA, jours vivants sans ventilation mécanique), mais aucun lien avec la mortalité n'a été retrouvé dans ce travail.

Une analyse protéomique de plasma de patients septiques a retrouvé une diminution drastique de nombreuses apolipoprotéines en comparaison avec le plasma de patients non-septiques.

Enfin, l'injection de HDL humaines reconstituées dans trois modèles murins de sepsis a mis en évidence une diminution de la mortalité, une diminution de nombreux marqueurs de l'inflammation et des concentrations bactériennes au niveau plasmatique et tissulaire.

**Conclusion** : au cours du sepsis, il existe à la fois des modifications quantitatives des HDL avec une diminution importante de leur concentration, mais aussi des modifications qualitatives avec en particulier une augmentation de la taille et des changements de composition de ces particules. La seule composante quantitative ne semble pas suffisante pour prédire le devenir des patients ; la dysfonction des HDL au niveau particulaire pourrait jouer un rôle important. L'injection d'HDL fonctionnelles a montré son efficacité dans plusieurs modèles murins. D'autres études pour caractériser ces dysfonctions sont nécessaires avant de mener à bien un essai randomisé évaluant l'injection thérapeutique de HDL au cours du sepsis chez l'homme.

**Mots clés** : HDL (dysfonction, taille), inflammation, sepsis, protéomique, injection thérapeutique.

## Liste des abréviations

ABCA1 : ATB-binding cassette A1  
Apo : apolipoprotéine  
ASC : aire sous la courbe  
ATP : adénosine-triphosphate  
AGC: automatic gain control  
BGN : bacille gram négatif  
BHI : brain heart infusion  
BSA : bovine serum albumin  
CE: collision energy  
CETP : cholesteryl ester transfer protein  
cf-DNA : cell-free Deoxyribonucleic acid  
CGP : cocci gram positif  
CLP : cecal ligation and puncture  
DAMP : damage-associated molecular pattern  
EGDT : early goal-directed therapy  
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay  
e-NOS : endothelial nitric oxide synthase  
HDL : high-density lipoprotein  
HLA-DR : human leukocyte antigen DR-isotype  
HMGB1 : high-mobility group box 1  
ICAM : intercellular adhesion molecule  
IDL : intermediate-density lipoprotein  
IGSII : indice de gravité simplifié II  
IL : interleukine  
IP : injection péritonéale  
JAK : Janus kinase  
KDIGO : kidney disease improving global outcomes  
LBP: lipopolysaccharide binding protein  
LC : liquid chromatography

LCAT : lecithin–cholesterol acyltransferase  
LDL : low-density lipoprotein  
LPS : lipopolysaccharide  
LTA : lipoteichoic acid  
MAPK : mitogen-activated protein kinase  
MDSC : myeloid-derived suppressor cells  
MS : mass spectrometry  
NET : neutrophil extracellular trap  
NFκB : nuclear factor kappa B  
NPV : negative predictive value  
Ox-LDL : oxidized low-density lipoprotein  
PA : *Pseudomonas aeruginosa*  
PAM : pression artérielle moyenne  
PAMP : pathogen—associated molecular pattern  
PARS : protease-activated receptors  
PBS : phosphate-buffered saline  
PCSK9 : proprotein convertase subtilisin/kexin type 9  
PICS : persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome  
PLTP : phospholipid transfer protein  
PON : paraoxonase  
PPV : positive predictive values  
PRM : parallel reaction monitoring  
PTSD : post-traumatic stress disorder  
RAC1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
RCT : reverse cholesterol transport  
rHDL : reconstituted high-density lipoprotein  
RHOA : Ras homolog gene family, member A  
ROS : reactive oxygen species  
SAA : serum amyloid A  
SIRS : systemic inflammatory response syndrome  
SOFA : sequential organ failure assessment  
SRB1: scavenger receptor class B type 1

TG : triglyceride

TGF- $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$

TLR : toll-like receptor

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha

t-PA : tissue plasminogen activator

VCAM : vascular cell adhesion protein

VLDL : very-low-density lipoprotein

# INTRODUCTION

# A. Le Sepsis

## I. Introduction et définitions

Des descriptions très détaillées de cas d'infection ont été rapportées dès la période antique. Au XVII<sup>ème</sup> siècle, les travaux de Boerhaave ont permis de mieux définir ce processus infectieux ; au XIX<sup>ème</sup> siècle Pasteur découvre les micro-organismes. Bien après ces pionniers, le terme de sepsis est apparu au XX<sup>ème</sup> siècle et a été défini par Bone et al. en 1992 (1). Le sepsis est alors décrit comme étant un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) associé à la présence d'une infection microbienne. Ce SIRS est une entité qui se caractérise par la présence d'au moins deux des signes suivants : une température supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C ; une tachycardie supérieure à 90 battements par minute ; une polypnée supérieure à 20/minutes ; une hyperleucocytose supérieure à 12000 GB/mm<sup>3</sup> ou une leucopénie inférieure à 4000 GB/mm<sup>3</sup>. Le SIRS représente ainsi l'expression d'une réponse inflammatoire systémique en réponse à une agression de causes variées telles qu'un processus ischémique, un polytraumatisme, une hémorragie ou encore une pancréatite aiguë. Lorsque la cause est une infection, on parle alors d'un sepsis. Lorsque le sepsis induit une hypoperfusion tissulaire avec en particulier une ou plusieurs dysfonctions d'organes, la dénomination appropriée est un sepsis sévère (2). Cette hypoperfusion tissulaire se caractérise par un certain nombre de signes parmi les suivants : hypotension artérielle, augmentation du lactate plasmatique, diminution du débit urinaire, hypoxémie, augmentation de la créatininémie, augmentation de la bilirubinémie et thrombopénie. Lorsque la défaillance vasculaire est exacerbée aboutissant à une hypotension artérielle persistante malgré un remplissage vasculaire bien conduit, la terminologie change alors pour choc septique. Le sepsis sévère et le choc septique sont grevés d'une mortalité de 10 à 40%

selon les études (3,4). Le score SOFA est un outil de stratification du risque qui est bien corrélé à la mortalité du patient septique (5) (cf box 1).

**Box 1 : Critères de sepsis, sepsis sévère et choc septique (1991)**

**Sepsis :**

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) est défini par au moins deux signes parmi :

- Température supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C
- Fréquence cardiaque supérieure à 90 bpm.
- Fréquence respiratoire supérieure à 20 par minute ou  $pCO_2 < 32$  mmHg
- Globules blancs  $> 12000/mm^3$  ou  $< 4000/mm^3$

**Sepsis sévère :**

Le sepsis sévère est défini comme un sepsis associé à des dysfonctions d'organe, une hypotension ou une hypoperfusion.

**Choc septique :**

Le choc septique est défini comme un sepsis associé à une hypotension et des anomalies de perfusion malgré un remplissage vasculaire bien conduit nécessitant l'administration de vasopresseurs.

**Box 1 :** Conférence de consensus américaine de 1991 définissant trois entités : le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), le sepsis sévère et le choc septique. D'après Hotchkiss et al. Nature reviews primers. 2016.

L'étude du sepsis et de ses traitements représente le reflet de notre compréhension de sa physiopathologie : alors que les années 1960 ont permis la caractérisation des microorganismes et le développement des antibiotiques, les années 1980 ont permis l'étude de l'interaction entre le pathogène et l'hôte et la caractérisation de la réponse de l'hôte face au pathogène (6,7). Les progrès en immunologie, la reconnaissance du soi et du non-soi par l'hôte, ont permis une meilleure compréhension du sepsis et de sa physiopathologie (8). Dans ce contexte, la dernière conférence de consensus sur le sujet a



voulu redéfinir le sepsis en insistant sur le fait que cette entité était avant tout une dysfonction d'organes secondaire à une dérégulation de la réponse de l'hôte face à sa rencontre avec le pathogène (9) (cf box 2). Elle a également mis en exergue le fait que les critères du SIRS n'étaient plus adaptés et étaient trop aspécifiques chez les patients de réanimation avec très certainement une sous-estimation de la gravité. Par exemple, un score SOFA supérieur ou égal à 2 reflète déjà un sur-risque de mortalité de 10%. Ainsi, deux états ont été définis :

- le sepsis, reflet d'une dérégulation de la réponse de l'hôte face au pathogène, défini par un score SOFA supérieur ou égal à 2.
- le choc septique défini par un sepsis avec une dysfonction circulatoire majeure nécessitant des vasopresseurs pour maintenir une PAM>65mmHg et une augmentation du lactate plasmatique >2mmol/l.

**Box 2 : Nouveaux critères de sepsis et choc septique (conférence « sepsis 3 », 2015)**

L'infection se traduit par une interaction entre l'hôte et un pathogène induisant une réponse locale ou systémique de l'hôte.

**Sepsis :**

- Dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital en raison d'une réponse exacerbée de l'hôte face à l'infection.
- Atteinte d'un ou plusieurs organes et cela quelque soit le site de l'infection.

**Choc septique :**

- Les anomalies circulatoires, cellulaires et métaboliques sont suffisamment profondes pour augmenter de manière importante la mortalité.
- Il est défini par la nécessité d'utiliser des vasopresseurs afin de maintenir une PAM > 65 mmHg et une augmentation du lactate plasmatique > 2 mmol/l.

**Box 2 :** conférence de consensus Sepsis 3 de 2015 : définition de deux entités distinctes : le sepsis et le choc septique. D'après Hotchkiss et al. Nature reviews primers. 2016.

## **II. Epidémiologie du sepsis**

### **II. a Incidence et prévalence**

L'incidence du sepsis est mal caractérisée, en partie par le manque de bases de données fiables répertoriant cette entité (10,11). Fleischmann et al. ont montré de manière rétrospective à l'aide de bases de données internationales colligées entre 1979 et 2015, que l'incidence du sepsis était de 288 pour 100000 habitants par an et du sepsis sévère de 148. Sur les dix dernières années, cette incidence augmentait respectivement à 437 et 270 pour 100 000 habitants. La mortalité estimée du sepsis était alors de 17% et de 26% pour le sepsis

sévère avec potentiellement plus de 5 millions de morts par an. Néanmoins, ces données épidémiologiques étant issues de bases de données colligées dans des pays à haut niveau de vie ; elles ne reflétaient pas l'épidémiologie du sepsis dans les pays en voie de développement pour lesquels peu de données existent (12–15). Par ailleurs, il est difficile d'obtenir des données d'épidémiologie de bonne qualité car les études utilisent des méthodes d'analyse variées et des définitions du sepsis différentes avec *in fine* une variabilité importante des résultats (16,17). Par exemple, en comparant quatre méthodes différentes de collecte de données intéressant des patients septiques d'une même cohorte, Gaieski et al. ont retrouvé des incidences de sepsis variant du simple au triple (4). D'autres raisons peuvent expliquer la difficulté à avoir des données fiables sur l'épidémiologie du sepsis. Par exemple, l'augmentation de l'incidence du sepsis mise en évidence à partir de bases de données issues des systèmes de soin nationaux ou internationaux est en partie due à une possible surestimation du taux de sepsis par les cliniciens suite à des mesures incitatives des systèmes de soin à inclure des états septiques. Une politique américaine d'augmentation des remboursements des soins de patients ayant eu un sepsis est un des exemples pouvant expliquer ce potentiel biais. Inversement, il est clairement établi que les diagnostics de sepsis sont plutôt mal répertoriés par les institutions (18,19) avec en particulier une tendance à ne pas tenir compte des sepsis les moins graves (19,20). Par ailleurs, alors que le nombre de patients septiques non hospitalisés demeure important, il s'avère que la plupart des cohortes ne colligent que les patients septiques hospitalisés, ce qui entraîne *in fine* une sous-estimation importante de l'incidence du sepsis (21).

## II. b Mortalité

A l'instar des données épidémiologiques concernant incidence et prévalence du sepsis, les données concernant la mortalité demeurent controversées et variables en fonction des études et des registres. Par exemple entre 1999 et 2009, la mortalité imputable à un sepsis semble avoir diminué sur des données issues de certificats de décès et de registres. Cependant, dans de nombreux cas, et en particulier chez les patients souffrant de pathologie chronique, la cause officielle du décès reportée par le clinicien s'avère souvent être la pathologie chronique du patient et non pas la pathologie entraînant la mort à savoir le sepsis (21). Une étude issue de registres australien et néo-zélandais a retrouvé une diminution de l'incidence de la mortalité attribuable au sepsis (22). Bien que le taux de patients qui mourraient d'un sepsis à l'hôpital était plutôt en diminution, plusieurs autres auteurs ont montré que la mortalité globale était plutôt en augmentation et cela parce que l'incidence même du sepsis était en progression (4,23).

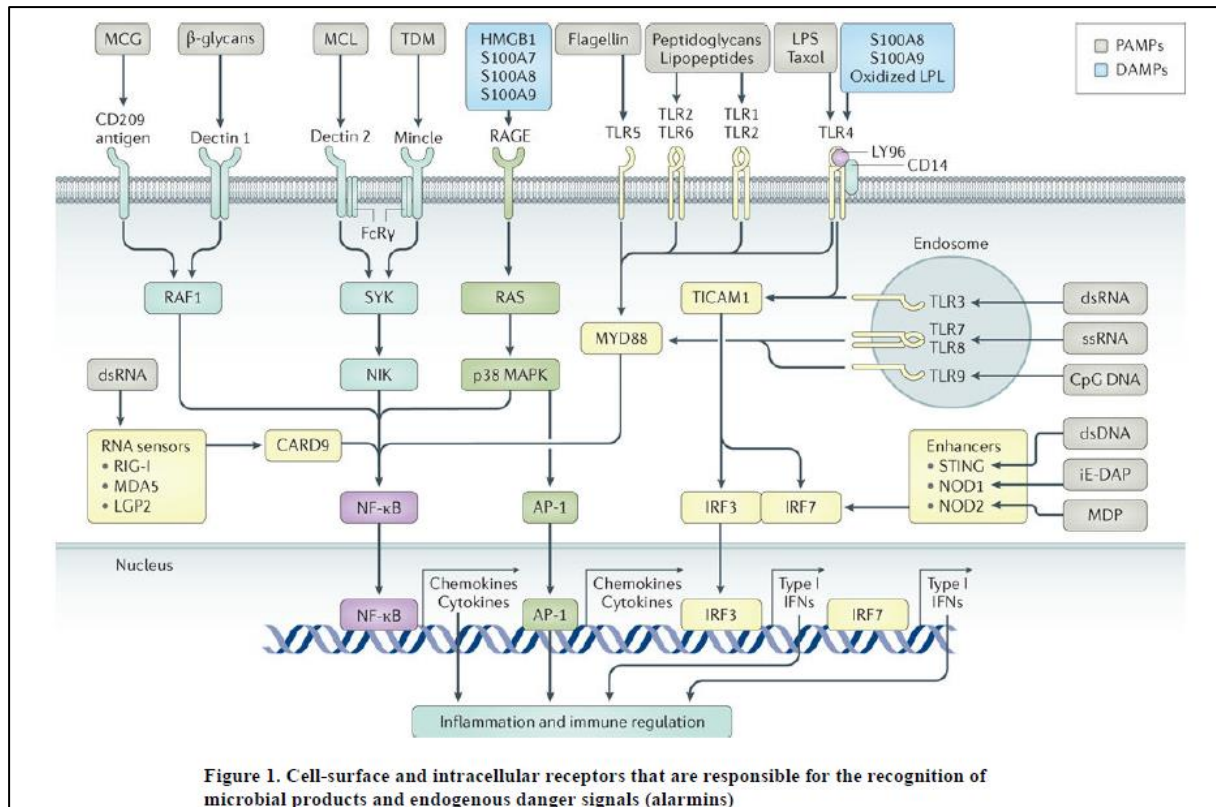
Concernant la mortalité de l'entité choc septique, les données épidémiologiques sont également assez controversées. Avec des taux variant entre 20 et 50%, il est clairement établi un lien entre la mortalité et l'expérience du centre (24). Alors que dans certains pays en voie de développement, la mortalité peut atteindre 50%, des études faites dans d'autres pays retrouvent une mortalité globale plus basse entre 20 et 30% (23–25).

## III. Physiopathologie

### III. a Inflammation

Le sepsis représente un modèle complexe d'inflammation aiguë exacerbée impliquant l'activation du système immunitaire inné (26). Il est initié en général par la reconnaissance simultanée par le complément ou par des récepteurs cellulaires de multiples

éléments de pathogènes et de signaux de danger (27). Ces cellules spécifiques sont variées ; il s'agit de cellules immunitaires, endothéliales ou encore de l'épithélium. Les récepteurs mis en jeu sont nombreux (toll-like receptors, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, retinoic acid-inducible gene-like receptors, mannose-binding lectin receptors...) (28). Ils vont interagir avec des éléments issus du pathogène appelés couramment pathogen—associated molecular patterns (PAMPs) et des éléments de l'hôte appelés damage-associated molecular patterns (DAMPs). De cette liaison vont découler différentes voies de signalisation intracellulaire complexes (29,30) (figure 1). L'activation de cette signalisation intracellulaire va entraîner l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation, l'immunité adaptative et le métabolisme cellulaire (30). En effet, l'interaction avec de nombreux pathogènes variés (virus, bactéries, levures...) et avec des motifs issus de l'agression tissulaire de l'hôte tels que les DAMPs va entraîner le recrutement de médiateurs pro-inflammatoires ayant pour conséquence une cascade de phosphorylation d'un certain nombre de protéine-kinases (mitogen-activated protein kinases (MAPKs), Janus kinases (JAKs)...) et l'activation de facteurs nucléaires tel que NFκB.



**Figure 1** : interaction entre les cellules de l'organisme et des éléments de pathogènes et signaux de danger (PAMPs et DAMPs). Cette liaison va entraîner un ensemble de systèmes de signalisation intracellulaire complexe aboutissant à l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation, l'immunité adaptative et le métabolisme cellulaire. D'après Hotchkiss et al. Nature reviews primers. 2016.

### III. b Activation précoce de gènes

L'activation de NFκB et sa translocation nucléaire vont induire l'expression de multiples gènes dont ceux de cytokines (TNF, IL-1, IL-12, IL-18...) qui vont initier alors une cascade activatrice menant à la production et la sécrétion d'autres cytokines et chémokines (IL-6, IL-8...). Cette expression va également entraîner l'inhibition d'éléments de l'immunité adaptative. L'activation de ce réseau va débuter dès les premières minutes après la reconnaissance des DAMPs et PAMPs par l'hôte (31).

Ainsi, l'activation des récepteurs tels que les TLR, l'activation du complément et la production de cytokines inflammatoires vont entraîner des effets quasi-simultanés sur la coagulation, l'endothélium vasculaire et le système lymphatique entraînant une augmentation de l'expression de sélectines et de molécules d'adhésion (32). L'altération de l'expression de protéines pro et/ou anticoagulantes, en particulier la thrombomoduline, le facteur tissulaire, le facteur de Willebrand, PAI-1 ou encore la protéine C activée, va avoir pour conséquence de rendre l'endothélium pro-coagulant. De plus, des protéases pro-inflammatoires vont induire une internalisation de cadhérine endothéliale (VE-cadherine) ce qui va entraîner une dysfonction des jonctions serrées augmentant ainsi de manière drastique la perméabilité capillaire (33).

### III. c Activation du complément

L'activation du complément va se dérouler dès l'interaction entre l'hôte et les PAMPs et avec les DAMPs. Cette activation va entraîner la génération de certains peptides du complément (C3a et C5a). C5a est probablement un des peptides pro-inflammatoire le plus actif produit au cours du sepsis et ayant une interaction importante avec les cellules de l'immunité telles que les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages (34). Avec le neutrophile, C5a va induire une cascade oxydative entraînant la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et le relargage d'enzymes impliquées dans des dommages tissulaires (35). De plus, C5a va stimuler la synthèse et le relargage de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires ce qui va exacerber la réponse inflammatoire. Tout ceci va également contribuer à induire une vasodilatation, des dommages tissulaires *et in fine* la survenue de défaillances d'organes (36).

### III. d Immunosuppression

Bien que la réponse pro-inflammatoire soit considérée comme la signature du sepsis, une phase dite immunosuppressive est aussi classiquement décrite (30). Le délai de cette phase demeure controversé ; cette phase a été décrite précocement mais aussi plus tardivement au cours d'un épisode septique. Cette entité a été définie récemment sous l'intitulé « inflammation, immunosuppression et syndrome catabolique » (37–39). Cette entité est en partie induite par les DAMPs et en particulier par l'ADN mitochondrial, des histones, HMGB1, la protéine S100, de l'ATP ou encore de l'adénosine (40). Cet état paradoxal d'immunosuppression peut se révéler par la survenue d'infections *de novo* chez des patients septiques (41). En particulier, il est couramment décrit une recrudescence de bactériémies ou encore la résurgence d'infection par des pathogènes opportunistes (42). Une réactivation virale est par exemple classiquement décrite (43). Des études autopsiques de patients décédés de sepsis et de choc septique ont confirmés cet état d'immunosuppression chez ces patients avec à la fois la présence dans 76% des cas d'infections secondaires essentiellement respiratoires (44) mais aussi une déplétion majeure en cellules de l'immunité et en cytokines pro-inflammatoires (45).

Les changements de l'immunité adaptative en réponse au sepsis sont profonds : en effet, une lymphopénie, l'apparition de neutrophiles immatures, la diminution de la production monocytaire de cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation dans la circulation sanguine du nombre de cellules suppressives d'origine myéloïdes (MDSCs) sont des modifications courantes observées au cours du sepsis (46–49). Les neutrophiles immatures ont classiquement une activité antimicrobienne altérée avec en particulier une diminution de la formation de neutrophil extracellular traps (NETs) (50,51). Ces neutrophiles immatures mais également les MDSCs ont la capacité de produire des cytokines anti-



inflammatoires (IL-10 et TGF $\beta$ ). De plus, le sepsis entraîne la perte de l'expression des molécule HLA-DR par les cellules présentatrices de l'antigène tels que les macrophages ou les cellules dendritiques. Il a été démontré que la perte de ces HLA-DR par les cellules présentatrices de l'antigène était associée à une augmentation de la morbi-mortalité chez des patients en sepsis (52). Une étude autopsique sur des patients décédés de sepsis a mis en évidence des phénomènes de mort cellulaire par apoptose et cela en partie à cause d'une immunosuppression innée et adaptative (53). En effet, les patients décédés de sepsis avaient une diminution drastique de cellules T, B et dendritiques. Ces constatations sur cadavres humains ont également été mises en évidence dans des modèles de sepsis expérimentaux (54). Cette déplétion apoptotique en lymphocyte contribue directement à la lymphopénie observée chez des patients en sepsis avec une corrélation nette avec la mortalité (55). Par exemple, le mécanisme de phagocytose des lymphocytes apoptotiques entraîne une libération de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou le TGF $\beta$  par les macrophages et les cellules dendritiques. Ce phénomène va également pouvoir contribuer à la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (56). Des études expérimentales s'attachant à diminuer l'apoptose induite par le sepsis ont montré des résultats intéressants avec par exemple une augmentation de la survie (54,57–59).

### III. e Dysfonction de la barrière endothéliale

En condition normale, l'endothélium permet de réguler la circulation et le débit des solutés, des hormones, de l'eau, des lipides, des protéines et d'une multitude de macromolécules au sein de l'appareil microcirculatoire. L'homéostasie est ainsi assurée grâce à la communication et aux jonctions entre les cellules endothéliales permettant de moduler le transit de molécules. Le sepsis va dérégler cet équilibre en perturbant ce réseau

de cellules et leur communication (60). Cette dysfonction de la barrière endothéliale est un point fondamental au cours du sepsis avec des phénomènes observés dès la phase précoce (30). L'interface entre le sang et l'interstitium est une zone d'interaction majeure que ce soit en condition normale ou en condition pathologique et ce sont les cellules endothéliales qui en sont les principaux éléments régulateurs (61). L'intégrité de l'endothélium est maintenue par les éléments du cytosquelette, les molécules d'adhésion intercellulaire (jonctions serrées) et un réseau de protéines de support. Au cours du sepsis, ces structures sont perturbées en partie à cause de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles, le relargage de médiateurs de l'inflammation et de radicaux libres (62). De plus, l'augmentation de l'expression de sélectines et d'intégrines et la liaison des leucocytes avec l'endothélium vont contribuer à augmenter la fuite capillaire et la migration de leucocytes via cette barrière endothéliale remaniée. Cet état va également permettre une polymérisation du collagène et la formation de caillots grâce à l'action du facteur tissulaire. Alors que ces stimuli permettent d'activer les plaquettes et les cellules de l'immunité qui vont ainsi atteindre certains tissus en réponse par exemple à un traumatisme ou une infection localisée, au cours du sepsis, la réponse devient disproportionnée et prolongée ce qui va entraîner des dommages tissulaires considérables.

Par ailleurs, le glycocalyx est également un composant important du réseau vasculaire (63). Il est composé d'une couche de polysaccharides liée de manière covalente aux lipides et aux protéines de membrane, permettant de maintenir un état anticoagulant en condition normale et de garantir la structure des jonctions serrées (64). Le sepsis va altérer la couche de glycocalyx ce qui va in fine augmenter la perméabilité endothéliale (65). Au cours de cette pathologie, le glycocalyx devient une cible pour les médiateurs de l'inflammation et les leucocytes puisque cette couche s'intègre totalement avec les

récepteurs situés sur la surface des cellules endothéliales (66). La présence considérable et étendue de ce glycocalyx au sein de l'ensemble du réseau microcirculatoire permet d'expliquer aisément pourquoi au cours des états septiques il existe des lésions tissulaires et une activation endothéliale majeure et cela même à une distance importante du site initial de l'infection (67).

Par ailleurs, de nombreux facteurs permettent de réguler l'expression des molécules de liaison des jonctions serrées et du réseau d'actine. Il existe par exemple les protéines RHOA et RAC1 qui appartiennent à la famille des GTPases. RHOA va permettre d'induire la rupture des filaments d'actine et l'internalisation des VE-cadhérines ce qui va entraîner une rupture de la barrière endothéliale (68). RAC1 va avoir un effet inverse en stabilisant le cytosquelette et en prévenant l'apoptose. RAC1 et RHOA sont régulées via la présence de récepteurs activés par les protéases (PARs) à la surface endothéliale. La génération de thrombine qui a lieu à la phase précoce d'un sepsis va activer PAR1 qui va induire une activation de RHOA et *in fine* une rupture de la barrière. A l'inverse, d'autres protéases vont activer PAR2 qui va activer à son tour RAC1 et permettre une protection de l'endothélium (69).

Cette fuite capillaire majeure induite lors du sepsis va avoir pour conséquence une perte massive de protéines intravasculaires et de plasma vers le secteur extravasculaire. La vasodilatation massive induite au sein du réseau microcirculatoire va pour sa part entraîner une altération du flux capillaire ce qui va contribuer à la mauvaise perfusion tissulaire.

### III. f coagulopathie

Au cours du sepsis, l'état basal anticoagulant qui règne au sein du réseau vasculaire est fortement perturbé (70). Le sepsis induit un état d'hypercoagulabilité caractérisé par la formation de microthrombi, un dépôt de fibrine, la formation de NETs et des lésions de l'endothélium. Les cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'autres médiateurs (facteurs d'activation plaquettaire, cathepsine G) vont avoir pour cible l'endothélium et les plaquettes. L'activation plaquettaire va permettre ainsi à la fois d'activer la coagulation mais aussi de générer une réponse inflammatoire en formant des agrégats qui vont activer le relargage de thrombine.

L'endothélium endommagé va activer le facteur Willebrand qui va alors secondairement induire une agrégation plaquettaire et la formation de fibrine. Les plaquettes peuvent également induire de l'inflammation en activant les cellules dendritiques. Cet endothélium activé va pouvoir aussi stimuler le facteur tissulaire qui va agir directement sur le facteur VII circulant entraînant une complexation facteur tissulaire-facteur VIIa permettant de convertir le facteur X en facteur X activé (Xa) ce qui va *in fine* aboutir à la génération de thrombine, le dépôt de fibrine, la formation d'un caillot, la synthèse de bradykinine et l'activation du complément (71).

Le dépôt du complément sur les globules rouges va entraîner une hémolyse et le relargage de microparticules membranaires issues des globules rouges qui ont un effet prothrombotique (72). L'interaction entre le facteur tissulaire et le facteur VIIa va propager un processus inflammatoire et entraîner un dépôt de fibrine sur l'endothélium. Ces microthrombi vont engendrer une diminution de la perfusion microvasculaire et la formation de thrombus. Cet état pro-inflammatoire va entraîner de l'inflammation majoritairement par la génération de cytokines et de facteurs de croissance.

Les anticoagulants endogènes qui inhibent en partie la cascade de la coagulation sont inhibés par le même processus qui activait le facteur tissulaire. Par exemple, les concentrations d'antithrombine et de protéine C activée sont diminuées au cours du sepsis (73). L'inhibition à la fois de la thrombomoduline et du récepteur de la protéine C contribue à la diminution de la concentration de protéine C activée (74). Par ailleurs, le processus de fibrinolyse diminue également en parallèle. L'augmentation de PAI-1 va inhiber à la fois l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA) et l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA). Cette dérégulation de la voie PAI-1- t-PA-u-PA va résulter en une diminution de la concentration de plasmine qui est nécessaire à la dissolution du caillot de fibrine (75). La génération de thrombine et sa liaison avec la thrombomoduline permettent d'activer l'enzyme inhibitrice de la liaison plasminogène-fibrine (TAFI) qui permet dans les conditions normales de réduire la génération de plasmine.

### III. g Formation du caillot :

L'inflammation et la coagulopathie sont intimement liées (76). A l'état basal, les cellules endothéliales ne vont pas exprimer des molécules d'adhésion qui permettent une liaison des leucocytes avec les plaquettes, mais vont le générer lors d'un épisode septique, en réponse à un stimulus inflammatoire précoce, ce qui va entraîner une activation de la coagulation (77). Les cytokines vont alors induire l'expression de récepteurs à la surface des cellules myéloïdes, des lymphocytes et des plaquettes. Les plaquettes vont se lier à la fibrine et ainsi exprimer des P-sélectines qui vont permettre la liaison entre le neutrophile et les plaquettes. Les neutrophiles activés vont produire des NETs entraînant la formation du caillot avec même un processus d'auto-amplification (70,78,79). Cette co-régulation de la formation du caillot et l'activation de l'immunité innée permettent localement de limiter les

lésions tissulaires. Cependant, au cours du sepsis et du choc septique, cette co-régulation est disproportionnée et va entraîner des lésions tissulaires diffuses avec des conséquences dévastatrices majeures pouvant aboutir au décès du patient (80).

#### **IV. Conséquences sur les organes**

Le sepsis va entraîner des désordres endothéliaux systémiques qui peuvent affecter tous les organes et cela en partie en lien avec le relargage dans la circulation sanguine des médiateurs et à l'orage cytokinique survenant lors de la phase précoce du sepsis.

##### **IV. a Atteinte neurologique**

Le patient présente typiquement un tableau d'altération de la vigilance se manifestant par de la confusion ou du délirium (81,82). Parfois, l'état comateux du patient nécessite une sécurisation des voies aériennes supérieures (intubation oro-trachéale).

##### **IV. b Atteinte pulmonaire**

Une des premières manifestations est l'augmentation de la fréquence respiratoire. La tachypnée peut être associée à des troubles acido-basiques typiquement une alcalose respiratoire par hyperventilation. Une hypoxémie et/ou une hypercapnie peuvent également être observées et en particulier en cas d'épuisement respiratoire et ainsi nécessiter une intubation oro-trachéale. Le tableau de dysfonction respiratoire au cours du sepsis est en partie dû à la formation de lésions de la membrane alvéolo-capillaire secondaires au relargage de médiateurs de l'inflammation (83). Cette dysfonction pulmonaire induite par les cytokines entraîne un œdème non cardiogénique qui peut entraîner une diminution majeure de la compliance pulmonaire et des échanges gazeux (84).

#### IV. c Atteinte cardio-vasculaire

Une dysfonction des cardiomyocytes est fréquemment retrouvée (85). Une dépression myocardique peut être observée au cours du sepsis (86,87). Même si cette théorie demeure controversée, de nombreuses cytokines ont des effets toxiques directs sur les myocytes (88,89). Cette dépression myocardique peut affecter à la fois le cœur droit et le cœur gauche. Le stress oxydant peut également contribuer à la dysfonction cardiaque et vasculaire et est une des causes d'hypoxie tissulaire (90,91).

#### IV. d Atteinte rénale

La dysfonction rénale est une cause majeure de morbidité induite par le sepsis (92). La physiopathologie de l'insuffisance rénale aiguë au cours du sepsis est complexe, mal comprise et difficilement transposable entre les études expérimentales et les études cliniques. Il peut exister des phénomènes ischémiques causés en particulier par une redistribution du débit de la médullaire au cortex avec un certain degré de désoxygénation médullaire (93). Une dysfonction tubulaire a également été décrite avec une toxicité directe induite par le sang septique lors de l'ultrafiltration. En effet, un certain nombre de cytokines, chimiokines et fragments du complément peuvent avoir un effet toxique direct sur la cellule tubulaire (94). Concernant les lésions rénales observées, la nécrose tubulaire a été classiquement décrite dans les dysfonctions rénales induites par le sepsis (92). Cependant, dans des études autopsiques de patients décédés de sepsis, la nécrose tubulaire aiguë semblait moins décrite (95,96). Les lésions tubulaires, l'infiltration de leucocytes ou des phénomènes apoptotiques sont plutôt minoritaires et retrouvés uniquement de manière focalisée avec la plupart des néphrons d'architecture normale (95–97). Il semble ainsi exister une dissociation majeure entre constatation histologique et fonction rénale. Une étude

expérimentale récente chez des moutons septiques a montré qu'à un stade d'insuffisance rénale aiguë sévère, il n'a pas été constaté de modification de la consommation rénale en oxygène ni de modification du débit artériel rénal (98). Sur le plan histologique, la seule modification observée était une atteinte mésangiale focale. Ainsi, cette étude renforce la théorie qu'il existe une réelle discordance entre lésion histologique et dysfonction rénale.

#### IV. e Atteinte hématologique

La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est une manifestation fréquente au cours du sepsis avec des conséquences pouvant être dramatique en terme de morbi-mortalité (99,100). Sur le plan clinique, la CIVD peut se présenter sous deux formes : sous la forme de saignements majeurs multi-sites ou sous la forme de thrombose des petits et moyens vaisseaux. Cette double présentation reflète la complexité de la coagulopathie du sepsis, équilibre entre les mécanismes de formation du caillot et les systèmes fibrinolytiques.

#### IV. f Atteinte hépatique

La dysfonction hépatique au cours du sepsis est courante, alors que l'insuffisance hépatique aiguë induite par le sepsis est plus rare, soit moins de 2% des patients (25). L'étiologie exacte de la dysfonction hépatique demeure inconnue (101). Une part importante des dysfonctions hépatiques semble être due à une nécrose centro-lobulaire secondaire à une mauvaise perfusion hépatique. Des séries autopsiques de patients décédés de sepsis ont mis en exergue des nécroses hépatocytaires situées autour du réseau hépatique veineux (45,53). En plus de cette nécrose hépatocytaire, il a été observé des mécanismes d'apoptose hépatocytaire (45,53).



## V. Prévention et biomarqueurs

### V. a Prévention

La prévention du sepsis et du choc septique repose essentiellement sur la reconnaissance précoce par le clinicien d'une infection et en particulier chez les populations à risque. Les diabétiques de type 1, les patients ayant un cancer, les insuffisants rénaux chroniques, les patients souffrants d'insuffisance respiratoire chronique ou encore les patients ayant une cardiopathie congestive sont particulièrement concernés. Par exemple, en communautaire, la vaccination des sujets à risque fait partie des moyens de prévention. Une prise en charge multimodale des patients à haut risque de sepsis telle qu'une nutrition adaptée, une réhabilitation physique et respiratoire au quotidien est à privilégier.

Chez les patients hospitalisés, il est important de s'attacher à réduire au maximum les durées d'hospitalisation, de préserver une hygiène lors des soins avec en particulier un lavage des mains, de diminuer les procédures invasives ou encore de limiter les durées de cathéters (102). La diminution des infections nosocomiales dans les institutions passe également par une surveillance accrue des risques d'épidémie.

### V. b Biomarqueurs

De nombreux biomarqueurs ont été testés dans le sepsis et le choc septique (103). Malheureusement, la sensibilité et spécificité de ces derniers sont décevantes (104). Par exemple, des marqueurs de l'inflammation tels que IL-6, IL-10, CCL2, CXCL10 ou encore HMGB1 ont montré une bonne corrélation avec la sévérité du sepsis dans les études de population, mais à l'échelle individuelle un réel manque de spécificité.

Néanmoins, la procalcitonine semble être intéressante à la fois pour distinguer un sepsis d'une pathologie non infectieuse et pour guider l'antibiothérapie (105). La procalcitonine est

un peptide précurseur de l'hormone calcitonine et est produite par les cellules parafolliculaires de la thyroïde et par les cellules neuroendocrines de l'intestin et du poumon. Chez les sujets sains, la procalcitonine est indétectable alors que sa concentration augmente chez le sujet ayant une infection bactérienne. Elle est en effet sécrétée sous l'influence d'endotoxines ou de cytokines pro-inflammatoires. De Jong *et al.* ont montré dans une étude multicentrique incluant plus de 1500 patients septiques ayant une infection bactérienne présumée, que les patients dont la stratégie thérapeutique était guidée par la procalcitonine avait une diminution de la durée de l'antibiothérapie mais aussi une diminution de la mortalité à 28 jours et à 1 an (106). D'autres études et méta-analyses ont retrouvé des résultats plus controversés (107,108).

## **VI. Prise en charge du sepsis**

Dès que le sepsis est diagnostiqué, une prise en charge précoce et dite « agressive » est une priorité, le délai de prise en charge étant crucial (109). Le traitement repose sur 3 points : le contrôle de la source infectieuse, la stabilisation hémodynamique du patient et la modulation de la réponse inflammatoire.

### **VI. a Contrôle de la source infectieuse**

La priorité dans la prise initiale du sepsis est l'administration d'une antibiothérapie adaptée et le contrôle de la source infectieuse. Dès que le diagnostic de sepsis est suspecté, une recherche de la source doit être entreprise associant examen clinique, examens d'imagerie médicale et prélèvements à visée microbiologique.

Une antibiothérapie adéquate doit être initiée le plus précocement possible et ne doit pas attendre la culture définitive des prélèvements (110). Une antibiothérapie adaptée

est primordiale car permet une diminution significative de la mortalité (111,112). L'antibiothérapie doit être initialement à large spectre avec une couverture des germes basées sur la source infectieuse mais aussi sur l'écologie locale et doit tenir compte de l'antibiothérapie récente administré au patient (113). Une association d'antibiotiques par rapport à une monothérapie demeure discutée (114,115). L'antibiothérapie probabiliste doit être secondairement adaptée aux résultats microbiologiques définitifs avec une désescalade thérapeutique à privilégier si possible afin de se limiter au spectre bactérien le plus étroit (116). Cette approche permet d'optimiser l'antibiothérapie la plus efficace, en limitant la toxicité, en prévenant les risques de résistance et de diminuer les coûts. Cependant dans un certain nombre de cas, plusieurs micro-organismes sont impliqués et dans environ 30% des cas, les cultures microbiologiques sont négatives (117). Chez ces patients-là, la désescalade est alors plus compliquée (118).

Les doses recommandées pour la plupart des agents anti-infectieux chez les patients septiques reposent sur les doses utilisées chez des patients non-hospitalisés en réanimation ou des volontaires sains. Néanmoins, la pharmacocinétique et pharmacodynamie des antibiotiques peuvent être altérées chez les patients de réanimation et en particulier chez ceux ayant une dysfonction rénale et/ou hépatique (119). Les thérapies telles que l'hémofiltration ou l'hémodialyse peuvent influencer leurs distribution et clairance obligeant d'adapter les doses (120,121). Enfin, et en particulier chez les patients chirurgicaux, l'éradication de la source infectieuse doit être une priorité.

## VI. b Stabilisation de l'hémodynamique

La prise en charge hémodynamique doit être précoce afin de restaurer une perfusion vasculaire et ainsi prévenir les dysfonctions d'organes (122). Le remplissage vasculaire fait partie avec les vasopresseurs des thérapeutiques de premier choix en privilégiant une approche individualisée (2,122). Même si les études sont très controversées, le monitoring hémodynamique peut être intéressant et en particulier chez les patients ventilés et sédatisés. L'évaluation du débit cardiaque peut être un bon indice hémodynamique en particulier pour la titration du remplissage vasculaire (123). Après la phase de stabilisation, une désescalade semble licite avec pour but d'obtenir une balance hydrique négative.

Un des aspects importants mais controversé de la prise en charge est une prise en charge dirigée et précoce ou « early goal-directed therapy » (EGDT). Dans une étude randomisée monocentrique, Rivers *et al.* ont démontré qu'une EGDT chez des patients septiques pris en charge aux urgences permettait de réduire la mortalité en comparant avec une prise en charge habituelle (124). Cette EGDT s'appuyait sur une stratégie reposant sur une titration des thérapeutiques à visée hémodynamique telles que le remplissage vasculaire, l'utilisation d'amines vasopressives, la transfusion de globules rouges et cela pour maintenir une saturation veineuse centrale (ScvO<sub>2</sub>) supérieure à 70%. Néanmoins, ces résultats positifs n'ont pas été confirmés dans plusieurs essais thérapeutiques multicentriques récents, probablement en partie car la prise en charge des patients dans les groupe contrôle s'est drastiquement améliorée par rapport à la prise en charge 15 années auparavant (125,126). Cependant, il faut noter que l'hétérogénéité des patients septiques rend probablement difficile la standardisation des soins ce qui complique fortement la mise en place de l'EGDT.

Les consensus internationaux, reposant sur de grandes études multicentriques recommandent l'utilisation des solutés cristalloïdes en première intention (2,127). L'utilisation des hydroxyéthylamidons est plus controversée avec même une interdiction par les autorités américaines et européennes après la publication d'études mettant en exergue une surmortalité chez des patients septiques (128). Une utilisation excessive du sérum physiologique doit être également évitée afin de limiter l'hyperchlorémie pourvoyeuse d'une toxicité rénale non négligeable (129).

Avec les solutés, les drogues vaso-actives sont également très fréquemment nécessaires afin d'améliorer la perfusion tissulaire. La noradrénaline doit être privilégiée à la Dopamine (130,131). Bien que son usage semble de plus en plus controversé, un agent inotrope positif tel que la Dobutamine peut parfois être associé à la Noradrénaline en particulier en cas de dysfonction myocardique associée. Le monitoring des lactates plasmatiques peut être un outil d'évaluation de l'efficacité des thérapeutiques utilisées pour restaurer la perfusion vasculaire (132).

Enfin, une prise en charge ventilatoire adaptée en tenant compte des interactions cœur-poumon est essentielle car elle peut diminuer l'agression pulmonaire (133). Cette prise en charge doit permettre une bonne oxygénation du patient, une ventilation adéquate adaptée à sa condition. Limiter la durée de ventilation mécanique en initiant dès que possible son sevrage doit également être un enjeu.

#### VI. c Modulation de la réponse inflammatoire

La réponse pro-inflammatoire précoce a été la cible de nombreux essais cliniques afin de l'inhiber (134). Plus de 150 essais cliniques ont tentés de cibler soit des récepteurs, soit les PAMPs ou les cytokines et médiateurs produits en réponse au sepsis (cf Tableau 1).

Aucun n'a fait preuve de son efficacité. Les raisons retrouvées pour expliquer ces échecs sont en partie liées à un mauvais timing d'administration, une mauvaise cible thérapeutique de l'agent, une inefficacité de la molécule avec parfois un effet toxique, des doses inadéquates, des populations d'étude trop hétérogènes, des biais méthodologiques d'évaluation ou encore des critères d'évaluation peu pertinents (135,136). Par ailleurs, certaines études évaluant des thérapeutiques à visée anti-inflammatoire ont mis en évidence une surmortalité (137–139). Ces résultats ont mis en relief la difficulté de mise en place des thérapeutiques en fonction du statut immunologique du patient ; ces médiateurs endogènes pro-inflammatoires sont par exemple probablement indispensables pour protéger l'immunité en cas de phase dite immunosuppressive. De nombreux essais thérapeutiques testant des molécules immunomodulatrices sont actuellement en cours ; soit en utilisant des immunostimulants, soit des agents anti-inflammatoires.

Target	Class	Study type	Drug	Finding	Refs
Endocrine abnormalities	Corticosteroids	Meta-analysis	Corticosteroid	No or modest effect	173,174
	Vasopressors	Prospective RCT	Arginine vasopressin	No effect	175
Endotoxin	Monoclonal antibody	Prospective RCT	HA-1A	No effect	176,177
			E5	No effect	178
	Lipid emulsion	Prospective RCT	GR270773	No effect	178
	Bactericidal-permeability increasing peptide	Prospective RCT	rBPI21	Modest effect	179
TLR4	Monoclonal antibody	Prospective RCT	TAK-242	No effect	180,181
			Eritoran tetrasodium	No effect	182
CD14	Monoclonal antibody	Prospective RCT	IC14	Unclear	182
TNF	Monoclonal antibody	Prospective RCT	BAY 1351	No effect	183,184
				No effect	
	Immunoedhesin	Prospective RCT	Lenercept Etanercept	No effect No effect	124,185
IL-1	Receptor antagonist	Prospective RCT	Anakinra	No effect	186
PAF	PAF antagonist	Prospective RCT	TCV-309	No effect	187,188
			Lexipafant	No effect	
Eicosenoids	NSAIDs	Prospective RCT	Ibuprofen	No effect	189
	Soluble phospholipase A2 inhibitor	Prospective RCT	Varepladib	No effect	190
C5e	Monoclonal antibody	Prospective RCT	CaCP29	Ongoing	49
Nitric oxide	L-N-methylarginine	Prospective RCT	546C88	Modest effect	191
	Reducing agents	Prospective RCT	Methylene blue	Modest effect	192
Hypercoagulability or disseminated intravascular coagulation	Activated protein C concentrate	Prospective RCT	Drotrecogin alfa (activated)	Beneficial No effect	141,193
	Tissue factor pathway inhibitor	Prospective RCT	Tifacogin	No effect	194
	Antithrombin	Prospective RCT	Antithrombin	No effect	195
	Anti-tissue factor antibody	Prospective RCT	ALT-836	No effect	196
	Heparin	Meta-analysis	Heparin salt	Modest effect	197
Thrombomodulin	Prospective RCT	ART-123	Modest effect	198	
Others	Intravenous immunoglobulin	Meta-analysis	Intravenous immunoglobulin	No effect	123
	Selenium (antioxidant)	Prospective RCT	Selenium	No effect	199
	Brdykinin antagonists	Prospective RCT	Deltibant	No effect	200
	N-acetylcysteine	Meta-analysis	N-acetylcysteine	No effect No effect	201,202
	Statins	Meta-analysis	Atorvastatin, simvastatin and roxusastatin	No effect	171
	Extracorporeal haemoperfusion	Prospective RCT	Adsorber EN500	No effect	203

PAF, platelet-activating factor; RCT, randomized controlled trial; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumour necrosis factor.

**Tableau 1 :** représentation des nombreuses cibles de la réponse pro-inflammatoire et des essais thérapeutiques testés au cours du sepsis chez l'homme. Ciblage soit des récepteurs, soit des PAMPs ou des cytokines et de médiateurs produits en réponse au sepsis. D'après Hotchkiss et al. Nature reviews primers. 2016.

#### VI. d La « sepsis team »

Malgré les progrès réalisés sur les 20 dernières années avec en particulier une amélioration des délais de prise en charge et la précocité des diagnostics, la morbi-mortalité du sepsis demeure importante avec des patients ne bénéficiant pas de soins appropriés et précoces. La prise en charge de ces patients étant complexes, l'émergence d'une « sepsis team » à l'instar de la « trauma team », comprenant médecins réanimateurs, infectiologues, infirmiers spécialisés et sensibilisés au sepsis semble bénéfique pour le patient et doit continuer à être évaluée (140,141).

#### VI. e Qualité de vie des patients

Pour évaluer l'efficacité d'une intervention ou d'un traitement, les critères généralement utilisés étaient essentiellement la mortalité à 28 jours ou le degré de défaillance d'organe. Cependant, bien que peu évaluée dans les études multicentriques, la qualité de vie après la sortie de la réanimation doit être une priorité. Les études récentes s'intéressant aux conséquences à moyen ou long terme du sepsis sont plutôt décourageantes (142,143). Il est important de noter que malgré une sortie de la réanimation, près de 50% des patients meurent dans les 3 mois et que 60% présentent des troubles psychologiques (144). Seulement une minorité des patients retrouve un équilibre fonctionnel satisfaisant. Peu de patients retournent au domicile avec souvent de nombreuses hospitalisations en long séjour pour réhabilitation. A la fois l'âge et la durée de séjour en réanimation sont des critères durs associés au devenir du patient (145,146). Les patients de plus de 55 ans et ceux qui ont séjourné plus de 15 jours en réanimation ont les taux de mortalité après la sortie de réanimation les plus élevés. Peu de données existent sur les conséquences fonctionnelles et cognitives après un épisode de sepsis.



Il existe par ailleurs un syndrome chez les sujets survivant de la réanimation caractérisé par la survenue d'insomnie, de cauchemars, d'une fatigue chronique, d'un état dépressif, de perte de l'élan vital et de facultés cognitives (147). Au moins 50% des patients survivant à la réanimation ont expérimenté au moins 3 de ces symptômes. Des déficits cognitifs et de la mémoire ont été décrits dans les 2 ans suivant l'hospitalisation (148). Le sepsis est aussi responsable de syndrome de stress post-traumatique (PTSD) (149). D'autres études se sont attachées à évaluer l'état fonctionnel des patients à la sortie de la réanimation (150). Les causes de ce déclin fonctionnel physique ou cognitif ne sont pas bien identifiées mais plusieurs raisons sont possibles : la première cause imputée est la faiblesse acquise en réanimation, conséquence de l'inactivité, l'immobilisation, l'inflammation, l'utilisation des corticoïdes ou des curares utilisés en pratique courante en réanimation. Chez 81% des patients qui survivent à un sepsis il est observé une perte musculaire conséquente responsable d'une diminution de la condition physique à 1 an (151).

## **VII. Perspectives**

### **VII. a Modulation de la réponse au sepsis**

Aucune thérapeutique activatrice ou inhibitrice de la réaction inflammatoire n'a prouvé son efficacité dans le sepsis et le choc septique (136,152). Malgré des résultats peu encourageants, des essais ciblant la réponse inflammatoire sont en cours. Deux études récentes ont montré un apport intéressant des corticoïdes chez des patients hospitalisés pour une pneumonie (153,154). Des études visant à augmenter la clearance des médiateurs de l'inflammation et les DAMPs et PAMPs sont en cours d'investigation (155).

Par ailleurs, définir l'état immunitaire du patient semble crucial afin d'adapter les thérapeutiques en fonction. En particulier, l'apport de l'immunothérapie peut être intéressante dans ce contexte (156,157). Par exemple, un immunophénotypage d'un patient avec par exemple la quantification de l'expression de HLA-DR peut être une piste sérieuse à étudier (158–160).

#### VII. b Thérapies immuno-stimulatrices

Un certain nombre de molécules sont en cours d'évaluation soit pour bloquer une réaction inflammatoire exagérée ou pour restaurer une immunité adaptée (cf Tableau 2). L'utilisation par exemple des facteurs de croissance leucocytaires ou de cytokines immunostimulatrices est encourageante (161,162). Certaines de ces thérapeutiques ont déjà été testées dans d'autres pathologies telles que le cancer et ont prouvé leur efficacité et innocuité (163).

Les progrès de la génomique, protéomique ou métabolomique sont également encourageants, avec des études préliminaires qui ont permis d'identifier des signatures complexes permettant de distinguer un état septique d'un état non septique mais également de distinguer des indices pronostiques et de réponse à la thérapie (164–166). Ces signatures génomiques vont potentiellement nous permettre d'identifier les patients qui vont répondre ou non à des traitements immunomodulateurs spécifiques, on parle de pharmacogénomique (167). Même s'il n'y a pas de preuves claires montrant que le polymorphisme génétique des gènes impliqués dans l'immunosuppression des patients septiques est associé à la sévérité de la pathologie, la personnalisation des soins est une tendance intéressante qui mérite d'être évaluée dans le futur (168). Il est en effet

probablement trop tôt pour affirmer que ces approches multimodales complexes vont apporter une plus-value dans la prise en charge des patients septiques.

Agent	Function	Findings	Refs
GM-CSF	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases myelopoiesis</li> <li>Activates monocytic or macrophage population-producing inflammatory cytokines and adhesion molecules</li> <li>Increases HLA-DR expression on antigen-presenting cells</li> <li>Increases neutrophil phagocytosis and killing in combination with IFN<math>\gamma</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Decreased the number of patient ICU days</li> <li>Decreased the APACHE II score*</li> <li>Trend towards improved survival</li> </ul>	147, 204–206
G-CSF	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases myelopoiesis</li> <li>Increases neutrophilia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Failed to improve outcome</li> </ul>	207, 208
IFN $\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases monocyte expression of inflammatory cytokines</li> <li>Increases HLA-DR expression and antigen presentation</li> <li>Increases macrophage and neutrophil bactericidal activity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reversed immunoparalysis</li> <li>Decreased mechanical ventilation time</li> </ul>	205, 209, 210
IL-7	<ul style="list-style-type: none"> <li>Induces T cell survival and proliferation</li> <li>Protects from apoptosis</li> <li>Recovers from T cell exhaustion*</li> <li>Increases T cell activation and adhesion molecule expression</li> <li>Increases IL-17-dependent neutrophil recruitment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Well tolerated</li> <li>Reversed key immunological defects in patients with sepsis</li> </ul>	146, 211, 212
IL-15	<ul style="list-style-type: none"> <li>Improves the development, function and homeostasis of memory CD8<sup>+</sup> T cells, NK cells, NKT cells and intestinal epithelial cells</li> <li>Induces the rapid proliferation of memory and naive CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells</li> <li>Increases the production of pro-inflammatory cytokines when combined with IL-12</li> <li>Increases dendritic cell activation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Still in phase I trials</li> <li>Preclinical trials have shown proliferation of NK cells, T cells and B cells, and resistance to T<sub>reg</sub> cell suppression</li> <li>Some dose-limiting toxicity at 3 mg per kg of body weight</li> </ul>	146, 213–215
Thymosin- $\alpha$ 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases CD4<sup>+</sup> T cell and NK cell numbers</li> <li>Augments T cell function</li> <li>Increases HLA-DR expression on antigen-presenting cells</li> <li>Enhances antiviral activity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Trend towards improved survival</li> </ul>	151, 216
PDL1-specific antibody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Releases checkpoint inhibition</li> <li>Prevents T cell exhaustion or T cell anergy</li> <li>Reduces T cell apoptosis</li> <li>Modulates myeloid cell interactions with the endothelium</li> <li>Potentially alters macrophage and neutrophil antimicrobial functions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Improved survival in animal models of sepsis</li> <li>Breakthrough status in several malignancies, including melanoma, squamous cell carcinoma, non-small-cell lung cancer and renal cell carcinoma</li> </ul>	217–219
CTLA4-specific antibody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Suppresses T<sub>reg</sub> cell expansion</li> <li>Reduces T cell apoptosis</li> <li>Releases checkpoint inhibition</li> <li>Prevents T cell exhaustion or T cell anergy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CTLA4-specific antibodies improved outcome to polymicrobial and fungal sepsis in rodent models</li> </ul>	217, 220
TIM3-specific antibody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Upregulates CD80 and CD86 expression on macrophages</li> <li>Downregulates inflammatory cytokine production</li> <li>Polarizes T cells towards a T<sub>H</sub>1 response</li> <li>Blocks lymphocyte apoptosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>TIM3 overexpression reduced the severity of rodent sepsis, whereas blocking TIM3 exacerbated inflammation</li> </ul>	221, 222
LAG3-specific antibody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Prevents T cell exhaustion</li> <li>Promotes T<sub>reg</sub> cell expansion</li> <li>Increases plasma dendritic cell activation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LAG3 cell-surface expression is increased in sepsis</li> <li>Has not been tested in rodent models of sepsis</li> </ul>	223, 224

CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HLA-DR, human leukocyte antigen-antigen D related; ICU, intensive care unit; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; LAG3, lymphocyte activating gene 3; NK cell, natural killer cell; NKT cell, natural killer T cell; PDL1, programmed death ligand 1; T<sub>H</sub>1, T helper 1; TIM3, T cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3; T<sub>reg</sub> cell, regulatory T cell.  
\*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score is a severity-of-disease classification system.

**Tableau 2 :** liste non exhaustive de molécules en cours d'évaluation soit pour bloquer une réaction inflammatoire exacerbée ou pour restaurer une immunité adaptée. D'après Hotchkiss et al. Nature reviews primers. 2016.



## B. Les lipoprotéines de haute densité (HDL)

### I. Structure des HDL

Les lipoprotéines sont des particules constituées de protéines dont les apolipoprotéines associées à une couche de phospholipides contenant un noyau lipidique composé de cholestérol libre, d'ester de cholestérol et de triglycérides (169). Elles sont classées en fonction de leur densité, proportionnelle à leur teneur en protéines : chylomicrons, lipoprotéines de très basse densité (VLDL), lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), lipoprotéines de basse densité (LDL) et lipoprotéines de haute densité (HDL). Ces dernières sont les particules ayant la plus forte teneur en protéines.

Plus précisément, les HDL sont définis par leur densité allant de 1,063 à 1,21 (170,171). Pour caractériser cette population de lipoprotéines, différentes techniques ont été utilisées et soulignent l'hétérogénéité des sous-classes de HDL. L'ultracentrifugation constitue la technique de référence et permet d'isoler les HDL en fraction HDL2a, HDL2b et HDL3 (172), tandis que l'électrophorèse sur gels à gradient sépare les particules HDL selon la taille (HDL2a, HDL2b, HDL3a, HDL3b, HDL3c) (173). L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'agarose a été utilisée pour séparer les populations de HDL selon leur charge et leur taille définissant ainsi de petites particules pré- $\beta$  et de grandes particules de HDL  $\alpha$ 1- $\alpha$ 4 (174). Enfin, Rosenson *et al.* ont décrit une nouvelle classification en fonction de la taille déterminée par résonance magnétique nucléaire (175).

Comparativement aux autres lipoprotéines, les HDL se caractérisent également par la quantité importante de protéines (176,177). Bien que les HDL soient principalement composées d'apolipoprotéine A-I (apoA-I), de récentes analyses protéomiques ont mis

l'accent sur les très nombreuses protéines transportées par les HDL, notamment des enzymes, des protéines de la phase aiguë, des protéines du complément ou encore des inhibiteurs de protéase (178,179).

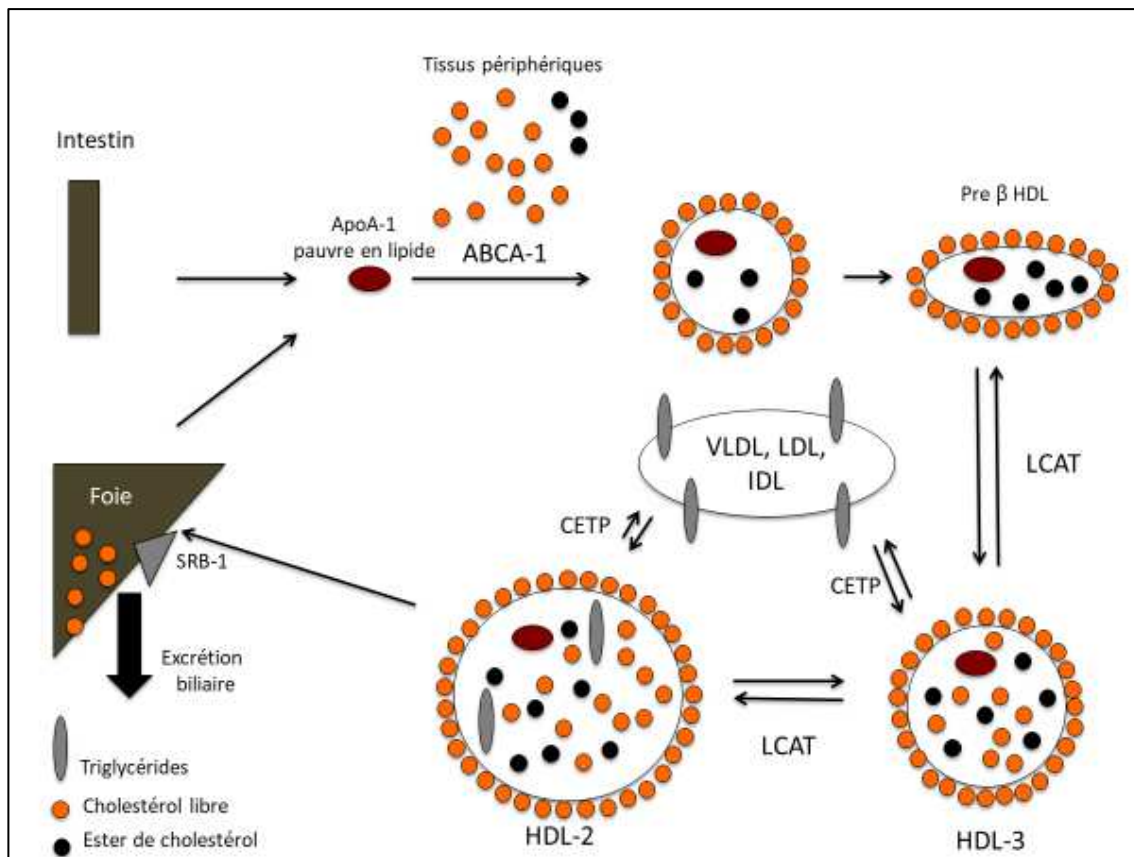
## **II. Métabolisme des HDL, catabolisme et fonction principale : le transport inverse du cholestérol (cf figure 2)**

Le métabolisme des HDL est complexe et influencé par de nombreux acteurs (récepteurs, protéines impliquées dans le transfert de lipides, transporteurs et enzymes). L'une des principales fonctions des HDL est le transport inverse du cholestérol (RCT) qui permet le transfert du cholestérol des cellules et tissus périphériques vers le foie. Le RCT est vraisemblablement la fonction principale des HDL et leur confère un effet athéro-protecteur (180–183).

La première étape de la biosynthèse des particules HDL est la libération d'Apo A-I sans lipides ou à faible teneur en lipides par le foie et l'intestin. L'Apo A-I à faible teneur en lipides va alors acquérir des phospholipides et du cholestérol libre issus des tissus périphériques par leur interaction avec le transporteur ABCA1, qui est une protéine exprimée par les macrophages et les hépatocytes (184). Avec l'acquisition de ces lipides, les particules de HDL deviennent discoïdales, appelées HDL pré $\beta$  (185,186). Ensuite, la lécithine-cholestérol acyl-transférase (LCAT), qui est activée par l'Apo A-I, va estérifier le cholestérol libre. L'estérification du cholestérol entraîne une modification structurale des particules de HDL, qui deviennent plus petites, denses et sphériques (HDL3) (187,188). Les HDL3 continuent d'incorporer le cholestérol libre et les apolipoprotéines formant des particules plus grosses, légères et riches en lipides appelées HDL2. HDL2 et HDL3 ont la possibilité d'échanger le cholestérol estérifié contre des molécules de triglycéride (TG) issues

d'autres lipoprotéines (VLDL, IDL, LDL). Les TG étant plus grosses que le cholestérol estérifié, cela participe activement à l'augmentation de la taille des particules de HDL. Cet important système de remodelage est réalisé par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) (189). Les HDL2 sont ensuite exclues de la circulation générale via un passage hépatique où le récepteur scavenger de classe B de type I (SRB1) capture les particules d'HDL2, entraînant ainsi la dégradation des lipides par les hépatocytes et leur excrétion dans la bile. Cette interaction avec SRB1 permet de libérer de l'Apo A-I pauvre en lipides, ce qui permet alors de débiter un nouveau cycle de transport inverse du cholestérol (190).

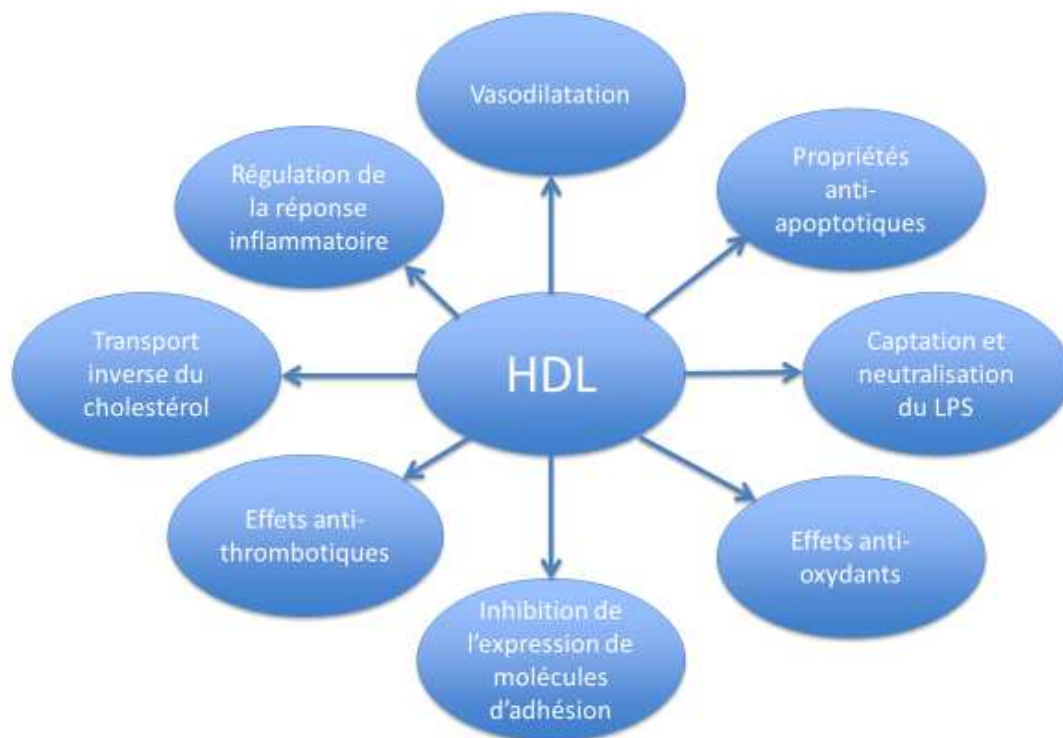
Le foie et les reins sont les principaux organes responsables du catabolisme des HDL : les lipides pauvres en Apo A-I sont absorbés par des récepteurs rénaux spécifiques (cubiline et mégaline) permettant leur dégradation (191). Dans le foie, différents récepteurs participent à l'endocytose des particules de HDL. L'une d'entre elles est la chaîne  $\beta$  de l'ATP synthase qui, en interagissant avec les HDL, conduit à la production d'ADP et à l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> qui déclenche l'endocytose des HDL (192). Le récepteur CD36 induit l'endocytose directe des particules de HDL et une absorption sélective du cholestérol estérifié présent dans les particules de HDL (193).



**Figure 2** : mécanisme de transport inverse du cholestérol par les HDL. L'ApoA-I issue du foie et de l'intestin va progressivement s'enrichir en cholestérol libre et en ester de cholestérol pour former la particule pré-β HDL. Elle va changer de conformation et de composition (HDL-3 puis HDL-2) en partie grâce à la LCAT qui estérifie le cholestérol et la CETP qui permet des échanges d'esters de cholestérol et de triglycérides avec d'autres lipoprotéines. Une fois mature, la particule de HDL va éliminer son cholestérol au niveau hépatique via le récepteur SRB-1. ABCA-1 : ATP-binding cassette A1 ; LCAT : Lécithine-cholestérol acyltransférase ; CETP : Cholesterylester transfer protein.



### III. Effets pléiotropes des HDL (cf figure 3)



**Figure 3** : propriétés pléiotropes des HDL : vasodilatation, effets anti-apoptotiques, anti-oxydants, anti-thrombotiques, capture et neutralisation du LPS, transport inverse du cholestérol, inhibition de l'expression de molécules d'adhésion et régulation de la réponse inflammatoire.

#### III. a Propriétés de liaison et de neutralisation du lipopolysaccharide (LPS) et de l'acide lipoteichoïque (LTA) des HDL (cf figure 4)

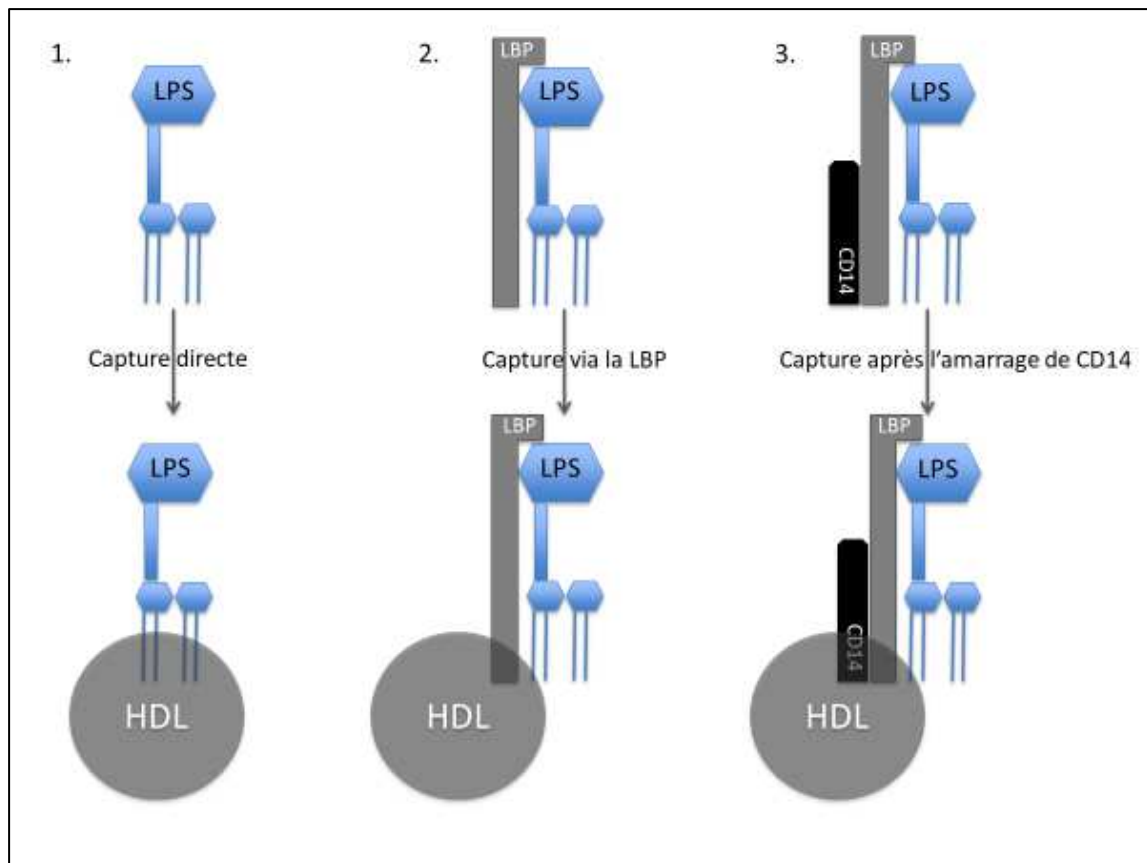
Le LPS est le principal composant de la membrane externe des bactéries Gram-négatives (BGN) (194). Chez les souches non encapsulées, le LPS est exposé directement à la surface de la cellule. Trois composants structuraux sont ainsi classiquement décrits : une chaîne de polysaccharides à noyau hydrophile, une chaîne latérale oligosaccharidique antigénique O- hydrophile répétitive propre au sérotype bactérien et une partie lipidique hydrophobe (lipide A).

De nombreuses études ont démontré que toutes les lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, LDL et HDL) sont capables de se lier aux LPS des bactéries Gram négatif (195–199). Cependant, il est clairement établi que le LPS se lie principalement aux particules de HDL et à un degré moindre aux autres lipoprotéines (198,200–202) ; Levels *et al.* ont incubé différents types de LPS marqués avec du plasma normal ou épuré de ses lipides et ont déterminé les profils de fluorescence du LPS par des techniques chromatographiques (203). Les auteurs ont montré que la liaison du LPS aux lipoprotéines était très spécifique et que les HDL avaient la capacité de liaison au LPS la plus élevée comparativement aux autres lipoprotéines (203,204). En outre, Levine *et al.* ont montré que des souris transgéniques exprimant l'Apo A-I humain présentaient des taux de cytokines plus faibles après injection de LPS que des souris témoins (205). Cette interaction est facilitée par l'action de protéines de transfert lipidiques spécifiques telles que la CETP, la protéine plasmatique de transfert lipidique (PLTP) et la protéine de liaison au LPS (LBP) (206,207). Ces protéines spécifiques permettent le transfert du LPS aux lipoprotéines. Par exemple, comme le décrivent Vesey *et al.*, la PLTP permet d'extraire le LPS des membranes bactériennes et de le transférer aux particules de HDL de sérum humain (208). Par ailleurs, Lamping *et al.* ont démontré dans un modèle murin de sepsis intrapéritonéal que l'injection intrapéritonéale de LBP recombinante permettait de limiter la libération de cytokines et de diminuer la mortalité induite par le LPS (209) ce qui renforce l'hypothèse d'une facilitation de la LBP dans l'association entre le LPS et la particule de HDL .

Toutefois, les mécanismes décrivant l'association entre LPS et HDL demeurent incertains (210) : La partie spécifique diglucosamine-phosphate au sein du lipide A semble être la zone clé permettant l'interaction entre le LPS et les particules de HDL (211). Pour caractériser cette interaction, des techniques de mesures par diffraction des rayons X ont

été effectuées en utilisant un synchrotron. En pratique, en l'absence de HDL, la forme moléculaire du lipide A est conique et en présence de HDL, ce lipide A devient cylindrique. Néanmoins, les particules de HDL ne sont probablement pas suffisantes pour neutraliser l'activité biologique du LPS (212). Théoriquement, il a été décrit que la LBP était probablement nécessaire pour former un complexe LPS-CD14 capable de se lier aux particules de HDL, permettant ainsi sa neutralisation.

En ce qui concerne les infections à Gram positif, le LTA est une molécule amphiphile formée par un polymère de polyphosphate hydrophile lié à un glycolipide neutre. C'est un composant majeur des bactéries à Gram positif (213,214). Grunfeld *et al.* ont ainsi démontré que les HDL pouvaient inhiber l'activation des macrophages induite par le LTA (215).



**Figure 4 :** capture et neutralisation du LPS par les HDL. 3 mécanismes sont proposés : une capture directe du LPS par les HDL, une capture indirecte par la LBP (LPS binding protein) et une association entre la particule de HDL, la LBP et CD14.

### III. b Inhibition de l'expression des molécules d'adhésion

Au cours d'un épisode septique, l'adhésion des leucocytes à l'endothélium est une étape clé permettant leur migration dans les tissus (216–218). Cockerill *et al.* ont montré que des concentrations physiologiques de HDL humaines isolées permettaient d'inhiber *in vitro* sur cellules endothéliales l'expression de molécules d'adhésion leucocytaire (V-CAM-1, ICAM-1, E-selectin) induites par les cytokines TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (219). Les HDL reconstituées ont également la capacité d'inhiber l'expression de V-CAM-1 induite par le TNF- $\alpha$ . Les mêmes auteurs ont confirmé cette action *in vivo* dans un modèle d'inflammation chez le cochon (220). Dans cette étude *in vivo*, à l'aide d'un modèle porcin d'inflammation cutanée où les animaux recevaient soit des HDL reconstituées (rHDL) soit du PBS, l'expression de la E-

sélectine des cellules endothéliales au niveau de la lésion cutanée a été significativement limitée par l'injection de ces HDL.

Une autre étude a montré que les rHDL permettaient d'atténuer l'expression des molécules d'adhésion cette fois-ci dans un modèle de choc endotoxinique chez des rongeurs (221). Le prétraitement de rats par des rHDL permettait en effet de limiter l'expression de la P-selectine et d'ICAM-1 au niveau rénal. Un autre mécanisme de protection endothélial a été décrit, il s'agit de la modulation de facteurs de transcription par les HDL avec en particulier une diminution de l'expression de molécules d'adhésion par l'inhibition de l'activité de NF-kB (222).

### III. c Régulation de la réponse inflammatoire des macrophages

Les HDL peuvent également être un modulateur clé de la réponse inflammatoire macrophagique (223–225). Les HDL peuvent par exemple stimuler le facteur de transcription ATF3 qui va pouvoir inhiber un certain nombre de voies pro- inflammatoires (225). De plus, des auteurs ont montré que la SAA (serum amyloid A) avait la capacité d'augmenter considérablement dans des macrophages murins l'expression et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tardifs comme certaines phospholipases (sPLA2-IIe et sPLA2-V) (226). Dans cette étude *in vitro* utilisant des HDL purifiées, ces derniers ont atténué la sécrétion de sPLA2-IIe et sPLA2-V induite par la SAA. Cette inhibition était dose-dépendante. Les HDL ont également permis de diminuer la synthèse de quelques cytokines (IL-6) et chimiokines (MCP-1 et RANTES).

### III. d Vasodilatation microvasculaire

Les HDL ont la propriété de stimuler la NO synthase endothéliale (eNOS), qui intervient dans l'inhibition de l'adhésion des monocytes à l'endothélium et qui favorise également un certain degré de vasodilatation microcirculatoire (227). Cette up-régulation de l'expression de la eNOS dépend du récepteur SR-B1. Les sous-classes de HDL se lient avec une affinité plus ou moins importante à SR-B1. En particulier, les ApoA-I pauvres ou sans lipides ont une affinité plus faible pour ce récepteur, ce qui va entraîner ainsi un moindre effet vasodilatateur (228). Les particules de HDL peuvent également stimuler la production d'un vasodilatateur puissant, la prostacycline. Kontush *et al.* ont montré par exemple que les HDL3 permettaient d'induire une production de NO plus importante que les HDL2 en raison de leur enrichissement en sphingosine-1-phosphate (S1P), qui permet de stimuler la production de prostacycline (229).

### III. e Effets antithrombotiques

Les HDL stimulent la production endothéliale de NO et de prostacycline qui sont des inhibiteurs de l'activation plaquettaire. De plus, les HDL préviennent l'hyperréactivité plaquettaire en limitant la surcharge intraplaquettaire en cholestérol et l'interaction de l'ApoA-I avec les récepteurs plaquettaires ABCA1 et SRB1 (230). Ceci conduit à une inhibition de la cascade pro-coagulante et la formation de caillots (231). Les HDL peuvent également prévenir l'activation thrombotique endothéliale, en favorisant la production de prostacycline et de Cox2 et également en limitant l'expression du facteur tissulaire et de molécules d'adhésion comme mentionné ci-dessus (232,233).

### III. f Propriétés antioxydantes

La Paraoxonase (PON1) est une estérase qui protège les lipoprotéines de l'oxydation (234–238). PON1 située en grande partie à la surface des HDL, est capable d'hydrolyser les peroxydes et en particulier les esters de cholestérol et phospholipides oxydés (234,239). Il a été démontré dans le cadre d'un sepsis expérimental, que PON1 était capable d'hydrolyser la phosphatidylcholine en lysophosphatidylcholine, ce qui a permis d'améliorer l'activité bactéricide des neutrophiles conférant ainsi à PON1 un effet protecteur (240). Shih *et al.* ont démontré que les souris déficientes en PON1 étaient sensibles au stress oxydatif et que les HDL isolées de ces souris n'ont pas permis d'empêcher l'oxydation des LDL (241). Les auteurs ont réalisé une co-culture de cellules endothéliales aortiques humaines et de cellules musculaires lisses prétraitées avec des HDL isolées à partir de souris de type sauvage ou déficientes en PON1. Les HDL isolées à partir de souris PON +/+ ont été capables de bloquer l'accumulation d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH) au sein de LDL humaines et ont permis ainsi de réduire considérablement la quantité et l'activité chimiotactique de la chimiokine MCP-1. Il n'a pas été montré les mêmes effets avec les HDL isolées de souris PON1-/- (241). L'un des principaux effets antioxydants des HDL dépend ainsi de leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL. Cette propriété consiste au transfert de lipides oxydés (hydroperoxydes et lysophosphatidylcholines) des LDL oxydées vers les HDL permettant ainsi l'inactivation de ces lipides oxydés (242). Enfin, les HDL sont capables de limiter le stress oxydant en diminuant la production de ROS par inactivation de la NADPH oxydase neutrophilaire (243).

### III. g Propriétés anti-apoptotiques

Les HDL exercent un effet anti-apoptotique sur les cellules endothéliales en interférant à la fois avec la voie extrinsèque impliquant les récepteurs et la voie intrinsèque d'apoptose mitochondriale. *Suc et al.* ont démontré que les HDL ont la capacité d'inhiber l'apoptose des cellules endothéliales induite par les LDL oxydées (244). Les mêmes résultats ont été trouvés après stimulation par le TNF- $\alpha$  (245). Dans l'apoptose induite par les LDL oxydées, il a été démontré que les HDL interagissent avec le réticulum endoplasmique (246). En effet, *Muller et al.* ont montré que le prétraitement de cellules endothéliales microvasculaires avec des HDL, suivi d'une incubation avec des LDL oxydées, réduisait significativement la phosphorylation d'IRE1 $\alpha$  et eIF2 $\alpha$ , deux protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique. Ils ont également rapporté que les HDL empêchent l'activation de deux médiateurs pro-apoptotiques JNK et CHOP. *De Souza et al.* ont montré que les HDL3 qui sont des particules de HDL de petite taille, dense et pauvre en lipides, peuvent protéger les cellules endothéliales de l'apoptose et de la génération de radicaux libres induite par les LDL oxydées (247). En utilisant des cellules endothéliales humaines matures isolées de la veine de cordon ombilical, *Nofer et al.* ont montré que les HDL pouvaient stimuler la voie anti-apoptotique Akt (248). Dans cette étude, les HDL étaient également capables d'inhiber l'activation des caspase-3 et -9.



#### IV. Modifications des lipoprotéines au cours du sepsis

En situation critique et en particulier au cours du choc septique, une diminution drastique de la concentration de lipides et de lipoprotéines a été bien documentée (249,250). De nombreuses études observationnelles ont montré que les concentrations de HDL cholestérol (HDL-C) diminuaient à la phase aiguë d'un sepsis (251–258). Van leeuwen *et al.* ont démontré chez des patients atteints de sepsis grave, que les concentrations de lipoprotéines chutaient rapidement, jusqu'à 50 %, par rapport aux concentrations initiales et que cette réduction rapide était particulièrement marquée pour les LDL et les HDL (251). Nous avons comparé le profil des HDL entre des patients septiques et des patients traumatisés (256). Bien que l'inflammation soit exacerbée dans ces deux entités, les taux de HDL-C étaient faibles chez les patients septiques, alors que leur concentration n'était pas modifiée en cas de traumatisme.

Au cours d'un épisode septique, plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette réduction spectaculaire ; une consommation accrue des particules de HDL, une diminution de la synthèse des HDL hépatiques, en particulier en cas d'insuffisance hépatique ou encore une clairance accrue suite à une dérégulation de SRB1 (259). Dans le contexte d'un choc septique caractérisé par une fuite capillaire massive induite par l'inflammation, les particules de HDL pourraient facilement être redistribuées du compartiment intravasculaire vers le compartiment extravasculaire expliquant ainsi cette diminution importante de la concentration plasmatique (250,251).

La majorité de ces études observationnelles ont souligné la corrélation négative entre la concentration de HDL-C et la mortalité (252–255). Une faible concentration de HDL-C à J1 a été associée de façon significative à une augmentation de la mortalité et de la morbidité

avec un seuil allant de 20 à 25 mg/dL (0,5 à 0,6 mmol/l) (254,258). Dans une étude prospective portant sur 151 patients septiques consécutifs, une faible concentration d'Apo A-I était indépendamment liée à une surmortalité à 30 jours (252). Il est intéressant de noter qu'une étude récente a montré que des variations géniques impliquées dans le métabolisme des HDL pourraient contribuer aux modifications des concentrations de HDL au cours du sepsis (260). Ces auteurs ont identifié une mutation faux-sens rare intéressant la CETP (rs1800777-A) qui était associée à des réductions significatives des concentrations de HDL durant le sepsis. Dans cette étude, les porteurs de l'allèle A présentaient une mortalité accrue, davantage de défaillance d'organe et nécessitaient davantage de thérapeutique de soutien d'organe que les non porteurs.

Cependant, d'autres études n'ont pas retrouvé de lien statistique entre les taux de HDL-C et la mortalité. Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre la mortalité et la concentration de HDL, mais un devenir péjoratif, défini comme soit le décès du patient soit un score SOFA > 6 à J3, était associé à des concentrations de HDL-C plus faibles dans une population de 50 patients septiques (256). Van leeuwen *et al.* n'ont trouvé aucune corrélation entre les concentrations de lipoprotéines chez les survivants et les non-survivants (251). Dans une population pédiatrique de sepsis à méningocoque grave, les taux de cholestérol total à l'admission étaient associés à une mortalité plus élevée, mais aucun lien statistique avec les HDL n'a été trouvé (261). Alors que la concentration de triglycérides était statistiquement associée à la mortalité, aucune corrélation n'a été trouvée avec les autres lipoprotéines et en particulier les HDL dans une population de sepsis chez l'adulte (257).

A l'instar de la mortalité, il a été trouvé dans plusieurs études un lien statistique entre morbidité et concentrations de HDL-C (257,262,263): Tsai *et al.* ont montré que dans

une cohorte de patients cirrhotiques atteints de sepsis grave, une faible concentration de HDL-C était associée à une mortalité plus élevée mais aussi à davantage de défaillance d'organe comme la fonction hémodynamique ou la fonction rénale (262). Lors d'un suivi de deux ans auprès de patients ayant subi un choc septique, de faibles concentrations de HDL au cours de l'épisode septique étaient associées à un risque accru de dysfonction rénale à la fois aiguë mais aussi chronique (263).

De plus, comme le sepsis demeure une cause importante de mortalité et de morbidité, des biomarqueurs précoces pourraient être utiles afin d'établir à la fois le diagnostic mais aussi pour en indiquer sa gravité. A ce jour, aucun biomarqueur ne répond à ces objectifs en termes de sensibilité et de spécificité (264). Dans ce contexte, certains auteurs ont suggéré que les concentrations de HDL pourraient représenter un marqueur précoce de la gravité d'un sepsis. Chien *et al.* ont souligné l'intérêt de la concentration de HDL-C et d'ApoA-I à J1 pour prédire la mortalité globale à 30 jours (254). Les aires sous la courbe ROC pour les HDL et les ApoA-I étaient respectivement de 0,84 (IC à 95 %[0,72-0,96]) et 0,87 (IC à 95 %[0,77-0,98]). Selon l'étude de Barlage *et al.* (252), à l'admission en réanimation, une faible concentration de HDL-C (ASC 0,6, p = 0,049) et d'ApoA-I (ASC 0,604, p = 0,041) étaient prédictives de la mortalité en lien avec un sepsis. Pour prédire la mortalité à 90 jours, Tsai *et al.* ont rapporté une sensibilité, une spécificité, des valeurs prédictives positives et négatives (PPV et NPV) respectivement à 0,794, 0,758, 0,871, 0,641 (262). Le seuil discriminant de la concentration de HDL-C était de 16,5 mg/dL. Dans une cohorte de 200 patients aux urgences présentant un tableau évocateur de sepsis, les taux de HDL ont été le meilleur outil prédictif de l'apparition d'un tableau de défaillance multiviscérale et de la mortalité à 28 jours (ASC respectivement 0,749 et 0,818) (255), comparativement à différentes variables comme les leucocytes, le lactate plasmatique ou le taux de plaquettes.

## V. Fonctions des HDL au cours des états inflammatoires

L'inflammation aiguë altère à la fois la composition et le métabolisme des lipoprotéines, ce qui *in fine* va réduire les propriétés anti-inflammatoires des particules de HDL (265–268). De nombreuses modifications de la composition des HDL ont été décrites au cours de ces états inflammatoires, telles que par exemple une moindre proportion d'ApoA-I au sein des HDL, une diminution de la quantité d'ester de cholestérol ou encore une diminution des enzymes habituellement associées aux HDL (LCAT, CETP, ou paraoxonase...) (251,269). Il est bien établi que la présence de LPS module la composition des particules de HDL. Par exemple, au cours d'une infection bactérienne ou d'un état inflammatoire, la SAA va prendre la place de l'apoA-I au sein des particules de HDL, devenant ainsi la principale protéine des HDL. Cette augmentation est totalement disproportionnée par rapport à la diminution drastique de l'ApoA-I (268–270). Cette observation a également été décrite dans les états inflammatoires consécutifs à une chirurgie cardiaque avec pontage coronarien (271).

La PON-1 associée aux HDL est également altérée dans les états septiques. Novak *et al.* ont décrit une diminution spectaculaire de l'activité de la PON-1 chez des patients septiques par rapport à des patients non septiques (272). Le stress oxydatif induit par le sepsis pourrait entraîner une liaison accrue des radicaux libres à la PON-1, entraînant ainsi une diminution globale de l'activité plasmatique de cette enzyme. L'activité de la PAF-AH (platelet activating factor acetylhydrolase ou Lp-PLA2), qui est capable d'inhiber la formation d'hydroperoxydes d'acides gras libres issus de LDL oxydées, est également modifiée dans des conditions septiques (273). Avec la réduction des activités de la PAF-AH et de la PON1 au cours du sepsis, les HDL présentent alors des effets protecteurs altérés contre l'oxydation des LDL (274).

Des études protéomiques récentes ont souligné la diversité des protéines associées aux HDL dans des conditions normales (178,179). Le protéome des HDL est clairement modifié lors de conditions inflammatoires (275). A notre connaissance, il existe seulement deux travaux s'intéressant à la protéomique des lipoprotéines au cours des états septiques. Sharma *et al.* ont par exemple montré que le protéome de patients ayant des sepsis secondaires à des pneumonies communautaires était fortement remanié entraînant une altération du cytosquelette, de l'assemblage cellulaire, des réponses du soi ou encore du métabolisme lipidique (276). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'il y avait chez les patients septiques une diminution de certaines apolipoprotéines (ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III et ApoE). Des dosages conventionnels de HDL-C et d'ApoA-I ont retrouvé les mêmes diminutions de concentration. Chez des patients septiques ayant une pneumonie nosocomiale, la même équipe a également montré une diminution des niveaux d'ApoA-I, ApoA-IV, ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE et ApoL (277).

Enfin, le transport inverse du cholestérol est également altéré en contexte inflammatoire (278–280). De la Llera *et al.* ont montré que chez vingt adultes en bonne santé, un choc endotoxique induit par le LPS (3 ng/kg) administré en bolus intraveineux a entraîné *in vivo* une diminution de l'efflux de cholestérol par les particules de HDL impliquant SRB1 et ABCA1 mais pas ABCG1 (268). Il est intéressant de noter qu'en comparant 10 patients septiques à 10 sujets sains, Guirgis *et al.* ont montré que l'efflux de cholestérol était diminué chez les patients septiques ( $24 \pm 1,2$  %) comparativement aux volontaires sains ( $31,5 \pm 1,0$  %) (281).

Dans ce contexte, le terme « HDL dysfonctionnelles » bien documenté dans certaines pathologies comme l'athérosclérose ou certaines maladies auto-immunes est apparu comme un nouveau concept de plus en plus étudié au cours du sepsis (184,274,275,278–

285). Il est maintenant établi que les HDL deviennent dysfonctionnelles au cours du sepsis, augmentant ainsi l'inflammation et le stress oxydatif ; et que ces HDL dysfonctionnelles sont associées de façon marquée à l'évolution péjorative des patients (282).

La taille des HDL est également affectée au cours des états inflammatoires et au cours d'épisodes infectieux (268,286). De la Llera *et al.* ont montré que l'administration de LPS chez des volontaires sains a entraîné une diminution de la proportion de particules de petite et moyenne taille (268). Ces auteurs ont rapporté que le choc endotoxinique induit par le LPS chez l'homme a provoqué une diminution des particules de HDL pré- $\beta$ 1a et des HDL de petites et de moyennes tailles, taille déterminée par électrophorèse 2D et résonance magnétique nucléaire (RMN). Une autre étude a souligné que la taille des HDL et la concentration de HDL étaient indépendamment associées au risque de pathologie coronarienne (287). Dans une étude récente portant sur 402 patients qui ont bénéficié d'une évaluation par IRM de leurs plaques d'athérome carotidiennes, la taille des particules de HDL était associée de façon significative à leur fonction d'efflux de cholestérol, ce qui suggère que les différences de capacité d'efflux peuvent être dues à des différences structurelles intrinsèques de ces HDL (288). Dans une cohorte de 504 patients, ceux ayant davantage de particules de HDL de petites et moyennes taille mesurées par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire avait statistiquement moins de calcification coronarienne (289). Cependant, étant donné les évaluations très disparates par des techniques très différentes de mesure de taille des HDL, la corrélation entre taille et fonction des HDL doit être exploitée avec prudence.

Ainsi, à la lumière de ces observations, la concentration de HDL n'est probablement pas suffisante pour caractériser la fonction des HDL. Les modifications de taille, le

remodelage des HDL entraînant des changements de composition de ces particules (le protéome en particulier) semblent probablement être plus pertinents à caractériser afin de définir des niveaux de dysfonction de ces HDL ayant potentiellement une implication clinique. Dans ce contexte, étant donné qu'il existe à la fois des modifications quantitatives et qualitatives de ces particules de HDL en conditions septiques, la supplémentation en HDL fonctionnelles dans des modèles précliniques expérimentaux semble pertinente.

## **VI. Les HDL synthétiques dans les études expérimentales sur le sepsis**

En raison de leurs propriétés pléiotropes, de la réduction drastique de la concentration des HDL et des dysfonctions observé lors de ces états inflammatoires tels que décrits ci-dessus, les HDL reconstituées ou les perfusions de peptides mimétiques d'ApoA-I représentent une nouvelle approche thérapeutique potentielle au cours du sepsis (259,290).

Plusieurs peptides mimétiques des HDL ont été synthétisés et sont capables de se lier aux phospholipides et de s'associer aux particules de HDL natives (291,292). Par exemple, le peptide mimétique ApoA-I 4F (Ac-DWFKAFYDKVAEKVAEKFKKEAF-NH<sub>2</sub>) a été synthétisé en utilisant une méthode de synthèse peptidique en phase solide (293). Zhang *et al.* ont montré dans un modèle de sepsis chez le rat que la perfusion de ce peptide diminuait la concentration plasmatique de IL-6, améliorait la fonction cardiaque et réduisait la mortalité (294). D'autres études ont démontré que ce peptide permettait d'atténuer les lésions rénales, cardiaques, vasculaires et pulmonaires et d'améliorer la survie dans des modèles expérimentaux de sepsis (295–299).

Les HDL reconstituées (rHDL) ont également été testées dans des modèles de sepsis expérimentaux (221,300,301). Différents types de rHDL ont été testées, mais les rHDL sont

généralement préparées avec un rapport ApoA-I / phosphatidylcholine de soja de 1/150 (302). Par exemple, McDonald *et al.* ont montré dans un modèle de choc endotoxinique chez le rat que la perfusion de rHDL a permis de limiter l'expression de la P-sélectine et d'ICAM-4 dans le glomérule rénal, d'atténuer les lésions parenchymateuses rénales et de réduire le degré de lésions histologiques au niveau pulmonaire, hépatique et intestinal (221).

## **VII. Perfusion de peptides mimétiques ou de rHDL au cours du sepsis chez l'homme ?**

Dans le domaine cardiovasculaire, les rHDL ont été testées chez des patients souffrant d'athérosclérose et de diabète. Par exemple, treize patients atteints de diabète de type 2 ont reçu à la fois des rHDL et du sérum physiologique dans le cadre d'une étude randomisée en crossover (303). A H4 et H72 de la perfusion de rHDL, il a été décrit une majoration des propriétés anti-inflammatoires de HDL isolées avec par exemple une diminution de l'expression de CD11b des monocytes ou encore une diminution de l'adhésion des neutrophiles sur une matrice de fibrinogène. Il est intéressant de noter également qu'il y a eu une augmentation de l'efflux de cholestérol.

Dans un contexte de pathologie coronarienne, Tardif *et al.* ont étudié les effets de l'injection de rHDL (CSL111®) sur la variation de volume de la plaque d'athérome évaluée par échographie (304). Dans cet essai contrôlé randomisé, 183 patients ont été randomisés pour recevoir soit du CSL111® (40mg/kg ou 80mg/kg) soit un placebo. Le groupe ayant reçu le CSL111® à dose plus élevée (80mg/kg) a été interrompu en raison d'anomalies du bilan hépatique. En ce qui concerne le critère principal d'efficacité de l'étude, il n'y a pas eu de réduction significative de la variation en pourcentage du volume de la plaque d'athérome dans le groupe CSL111® (40mg/kg) comparativement au placebo.



Dans les études précliniques, la capacité des HDL à se lier au LPS a été bien corrélée à leur teneur en phospholipides (205). Dans ce contexte, il a été développée une émulsion phospholipidique sans protéine contenant de la phosphatidylcholine, des triglycérides et du cholate de sodium afin d'optimiser la fixation et l'élimination du LPS (305). Dans une étude en crossover de phase I en double aveugle, 10 volontaires masculins ont ainsi reçu soit une perfusion de placebo, soit une émulsion de 92,5% de phosphatidylcholine et 7,5% de triglycérides. Il n'y a pas eu d'effet indésirable constaté. L'administration de cette émulsion a permis d'observer une tendance à l'augmentation du cholestérol total dû en partie à une augmentation de la concentration des LDL. La concentration d'HDL a diminué immédiatement après la fin de la perfusion de cette émulsion, mais a secondairement augmenté à des niveaux supérieurs à ceux constatés dans le groupe placebo à 24 heures. En revanche, la concentration d'apoA-I a augmenté régulièrement au cours de l'administration de l'émulsion, ce qui laisse à penser qu'il y a probablement une diminution de la concentration de cholestérol par particule de HDL. De plus, dans une autre étude contrôlée contre placebo, il a été étudié l'administration de cette même émulsion contre placebo chez 20 volontaires sains chez qui un choc endotoxinique a été réalisé en administrant du LPS d'une souche d'*Escherichia coli* par voie intra-veineuse (306). Les concentrations de TNF-alpha, d'IL-6 et le taux de neutrophiles étaient moindres chez les volontaires ayant reçu l'émulsion.

Ces résultats encourageants impliquant des volontaires sains ont conduit à la réalisation d'un essai multicentrique de phase II randomisé et contrôlé contre placebo évaluant une perfusion d'émulsion phospholipidique dans un contexte de sepsis sévère à bactéries Gram négatif. Cependant, l'étude « Lipid Infusion and Patient Outcomes in Sepsis » (LIPOS) n'a pas permis de démontrer une réduction de la mortalité à 28 jours ou la

diminution des défaillances d'organe (307). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats décevants. Premièrement, le délai d'administration (dans les 12 heures suivant l'admission) a été probablement trop tardif comparativement au délai dans les études animales (308,309). Deuxièmement, il n'y avait pas de protocole de soins standardisé dans cette étude internationale recrutant dans 31 pays différents. Troisièmement, il existait un biais de recrutement important lié à une très grande hétérogénéité des patients recrutés. Quatrièmement, parce que les patients traités par la protéine C activée recombinante ont été exclus du protocole, beaucoup de sepsis sévère et de choc septique ont été exclus de cette étude avec ainsi au final une forte proportion de patients post-opératoires ayant des sepsis intra-abdominaux inclus dans cette étude ce qui pourrait représenter un potentiel biais. Enfin, contrairement aux études précédentes, aucun lien statistique n'a été retrouvé dans cette étude entre le taux de mortalité toutes causes confondues à 28 jours et la concentration basale de cholestérol. Il est intéressant de noter que les concentrations en HDL et en Apo-A-I n'ont pas été évaluées dans cette étude.

Jusqu'à présent, aucune étude randomisée utilisant des rHDL ou des peptides mimétiques n'a été menée chez des patients septiques. Néanmoins, Pajkrt *et al.* ont testé les effets des rHDL dans le cadre de choc endotoxémique chez l'homme (310) : 8 volontaires masculins en bonne santé ont été recrutés dans le cadre d'une étude randomisée à double insu, en crossover et contrôlée par placebo. Les rHDL administrées sur 4 heures à la dose de 40 mg/kg ont réduit de façon spectaculaire la réponse inflammatoire induite par l'injection de LPS : en effet, la perfusion de rHDL a permis de diminuer les symptômes cliniques induits (moins de frissons, de myalgies, de dorsalgie ou de vomissements) et a considérablement réduit la libération des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8. De plus, la perfusion de rHDL a été associée à une diminution de l'expression du CD14, le principal récepteur du LPS sur les

monocytes. La même équipe a également rapporté que la perfusion de rHDL pouvait aussi affecter l'activité fibrinolytique et pouvait directement réduire l'agrégation des plaquettes, diminuer la concentration plasmatique de l'activateur tissulaire du plasminogène entraînant ainsi une modification de l'état procoagulant très spécifique au cours du choc endotoxinique (311).

### **VIII. Conclusion de la partie HDL**

En résumé, en plus de leur action de transport inverse du cholestérol, les HDL présentent de nombreux effets pléiotropes tels que la neutralisation du LPS, la protection endothéliale, ainsi que des propriétés antioxydantes et anti-apoptotiques. Le sepsis va induire une diminution considérable de la concentration des HDL, mais aussi modifier leur composition, leur métabolisme et leurs fonctions. Ces résultats mettent en relief le fort potentiel thérapeutique de la perfusion de peptides mimétiques ou de rHDL au cours du sepsis chez l'homme. Avec une amélioration significative de la survie, les études expérimentales utilisant des rHDL ou des peptides mimétiques sont en effet très encourageantes. Cependant, d'autres études expérimentales sont probablement nécessaires afin de mieux caractériser ce nouveau concept de dysfonction des HDL très largement associé à un mauvais pronostic. Une meilleure compréhension de la fonction de ces particules nous incitera ainsi peut être à nous lancer dans un essai clinique testant l'effet d'un traitement par injection de HDL au cours du sepsis.



**Au cours de ce travail, notre démarche a été translationnelle avec un développement en cinq axes :**

- La première partie de l'exposé s'est intéressée à la comparaison des profils lipidiques de deux populations d'inflammation exacerbée, le sepsis et le polytraumatisme.

- Dans la seconde partie de la thèse, nous nous sommes intéressés aux modifications structurales des HDL au cours du sepsis et en particulier des modifications de taille.

- La troisième partie s'est attachée à observer l'évolution des profils lipidiques au cours du temps chez des patients septiques hospitalisés en réanimation.

- Au cours de la quatrième partie de ce travail, nous avons voulu caractériser la composition en apolipoprotéines des HDL et du plasma au cours du sepsis. Une analyse protéomique a ainsi été réalisée en comparant des patients septiques de réanimation avec des patients obèses hospitalisés en vue d'une chirurgie bariatrique et des volontaires sains.

- Enfin dans la dernière partie de la thèse, dans une perspective thérapeutique, nous nous avons testé l'efficacité de HDL reconstituées humaines (CSL111) dans des modèles murins de sepsis.



# RESULTATS

## **Partie 1. Comparaison des profils lipidiques de patients septiques et de patients polytraumatisés en réanimation : résultats de l'étude LIPIDO**

*Cf annexe 1 : Tanaka et al. Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit. Annals of Intensive Care. 2017*

### **I. Etats des connaissances :**

De nombreuses études cliniques se sont intéressées à caractériser les profils lipidiques en condition inflammatoire. Van leeuwen *et al.* ont montré que chez des patients septiques de réanimation, la concentration de HDL-C pouvait rapidement diminuer avec une réduction pouvant aller jusqu'à 50% (251). Chien *et al.* ont montré qu'une concentration basse de HDL-C à J1 d'un épisode de sepsis sévère était significativement associée à une augmentation de la mortalité et de la morbidité (254).

Concernant les patients traumatisés, le SIRS survenant après un traumatisme résulte de nombreux mécanismes tels qu'une stimulation neutrophilaire ou encore le relargage de facteurs endogènes (DAMPs) issus de l'atteinte traumatique entraînant l'expression exacerbée de cytokines pro- et anti-inflammatoire (312–314).

Alors que les niveaux plasmatiques des HDL et des autres lipoprotéines sont plutôt bien caractérisés au cours du sepsis, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée au profil lipidique des patients traumatisés.

Le but de ce travail a été de comparer les profils lipidiques de patients septiques et traumatisés en réanimation et de caractériser les associations entre ces profils lipidiques, la sévérité et le pronostic de ces patients.



## **II. Méthodes :**

### II. a Méthodologie de l'étude et sélection des patients :

Il s'agissait d'une étude prospective, observationnelle et monocentrique conduite chez des patients hospitalisés en réanimation chirurgicale de l'hôpital universitaire de Bicêtre. 75 patients consécutifs ont été inclus entre juillet et septembre 2014. Tous les patients adultes traumatisés avec au moins 2 critères de SIRS et tous les patients admis pour choc septique ou sepsis sévère selon les critères de la Surviving Sepsis Campaign (SSC 2012) ont été inclus. Compte-tenu de potentiels troubles du métabolisme des lipides et de dysfonction hépatique associée, les patients cirrhotiques ou immunodéprimés ont été exclus de l'étude. L'étude a été approuvée par le comité de protection des personnes de l'université Paris VII numéro SC 13-026, ID RCB 2013- A0141837.

### II. b Recueil des données :

Les caractéristiques démographiques des patients, le diagnostic, les scores de gravité SAPSII, SOFA et ISS (Injury Severity Score), ainsi que les données cliniques ont été recueillis de manière prospective. En cas de sepsis, le site de l'infection et le type de bactérie ont été également recueillis.

Pour chaque patient, le prélèvement sanguin a été effectué à l'admission en réanimation. Les concentrations plasmatiques de cholestérol total, HDL-C, LDL-C et de triglycérides ont été recueillies. Les données du ionogramme sanguin et de la numération formule sanguine d'entrée ont été également colligées. Ces analyses ont été effectuées dans le laboratoire de l'hôpital Bicêtre. Les concentrations de cholestérol total, HDL et triglycérides ont été déterminé par une méthode enzymatique de routine (analyser Bayer ADVIA 1650) et le LDL-C a été calculé en utilisant l'équation de Friedwald. Les valeurs

normales de l'hôpital Bicêtre étaient : LDL-C :  $N < 4,2 \text{ mmol/l}$  ; HDL-C :  $1,0 < N < 2,0 \text{ mmol/l}$  ; cholestérol total  $3,4 < N < 6,2 \text{ mmol/l}$  et triglycérides :  $0,45 < N < 1,7 \text{ mmol/l}$ .

La mortalité en réanimation, la durée de ventilation mécanique, la durée de séjour en réanimation et à l'hôpital, le recours à la dialyse et aux vasopresseurs, le score SOFA à J3 et J7 ont été colligés. Un devenir dit péjoratif à J3 a été défini comme étant soit la survenue d'un décès soit un score SOFA  $> 6$ .

## II. c Analyse statistique :

Les variables qualitatives ont été exprimées en nombres et pourcentages, et les variables quantitatives en moyenne  $\pm$  déviation standard ou en médianes (IP25 - IP75) dans le cas d'une distribution non Gaussienne. La distribution normale a été recherchée en utilisant le test de Shapiro-Wilk.

Une comparaison bivariée entre les 2 groupes (trauma et sepsis) a été réalisée en utilisant le test de Chi-2 (test de Fisher exact si  $n < 5$ ) pour les variables qualitatives et le test t de Student pour les variables quantitatives (ou le test U de Mann-Whitney pour les distributions non-gaussienne). Les niveaux lipidiques ont été également ajustés sur l'âge et le sexe. Etant donné une importante différence d'âge entre les 2 groupes, nous avons effectué une analyse de sensibilité en regroupant les patients selon l'âge ( $\pm 5$  ans) et le sexe en utilisant le test de Wilcoxon.

Dans le sous-groupe de patients septiques, nous avons regardé l'association du profil lipidique avec la sévérité du sepsis à l'admission et avec les variables du pronostic après un ajustement sur le sexe et l'âge. Nous avons également recherché une association entre profil lipidique et espèce bactérienne (bactéries Gram négatives ou positives) dans le sous-groupe de patients septiques.

Tous les tests statistiques ont été réalisés avec un risque  $\alpha$  à 5% et les analyses ont été effectuées avec le logiciel SAS 9.4.

### **III. Résultats :**

#### III. a Profil lipidique chez les patients traumatisés et les patients septiques :

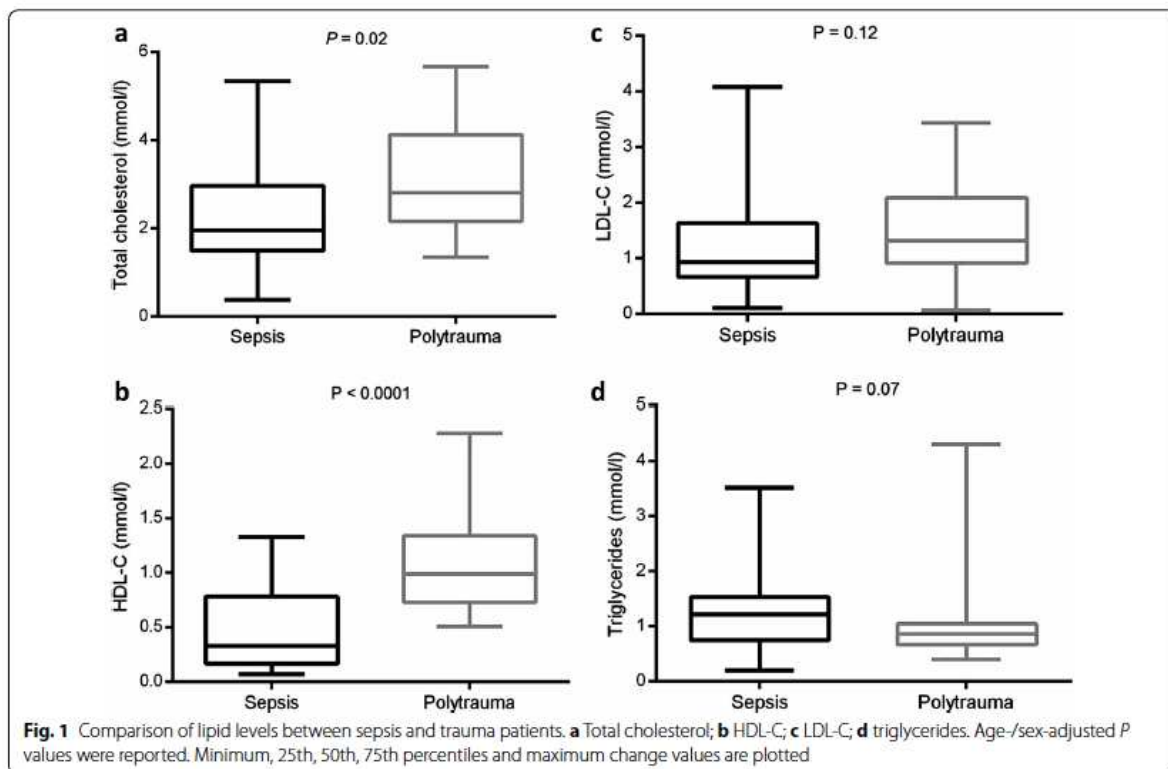
Sur les 75 patients inclus, 50 ont été admis pour sepsis et 25 pour traumatisme grave. Comme le montre le Tableau 1, les patients traumatisés étaient plus jeunes que les patients septiques ( $p < 0,0001$ ). Il n'y avait pas de différence de SOFA et d'IGS2 entre les 2 groupes. Les péritonites étaient l'étiologie la plus fréquente ( $n=22$ , 44%), suivie des pyélonéphrites ( $n=11$ , 22%), des angiocholites ( $n=9$ , 18) puis des autres causes ( $n= 8$ , 16%). Concernant les patients septiques, 14 d'entre eux (28%) ont été admis pour sepsis et 36 (72%) pour choc septique en accord avec la récente conférence de consensus Sepsis-3 (9).

Les patients septiques avaient une concentration de cholestérol total inférieur à celui des patients traumatisés (Figure 1). Concernant le profil des lipoprotéines, seulement celle du HDL-C différait significativement entre les deux groupes. Les patients septiques avaient une concentration en HDL-C plus basse que les traumatisés (0,33mmol/l [0,17-0,78] versus 0,99 [0,74-1,28] ; avec ajustement sur l'âge et le sexe,  $p < 0,0001$ ). En appariant les patients en fonction de leur âge et de leur sexe, nous avons trouvé les mêmes différences en HDL-C (0,19mmol/l [0,14-0,92] versus 0,98 [0,70-1,30],  $p < 0,0001$ ). Ces résultats sont présentés dans le tableau S1.

Characteristics	Overall (n = 75)	Sepsis (n = 50)	Trauma (n = 25)	P*
Age (years)	62 [45–74]	68 [57–78]	38 [28–56]	<0.0001
Male	53 (70.7)	36 (72.0)	17 (68.0)	0.72
Weight (kg)	77.3 ± 16.0	76.0 ± 17.3	80.0 ± 13.0	0.31
Lipid medications <sup>a</sup>	7 (9.3)	6 (12.0)	1 (4.0)	0.41
ISS	–	–	29 [20–41]	–
SAPSII	40 [29–56]	42 [30–59]	39 [26–45]	0.31
SOFA day 1	7 [5–8]	7 [4–9]	7 [5–8]	0.89
Norepinephrine day 1 (µg/kg/min)	0.1 [0.0–0.4]	0.1 [0.0–0.4]	0.1 [0.0–0.3]	0.83
Glasgow score day 1	14 [13–15]	15 [14–15]	13 [7–15]	0.0033
Leukocytes/mm <sup>3</sup> day 1	14,000 [7180–21,280]	13,920 [7350–22,350]	14,250 [7180–19,200]	0.54
Hematocrit day 1 (%)	33 ± 7	33 ± 7	33 ± 7	0.83
Creatinine day 1 (mmol/l)	98 [69–136]	102 [71–163]	92 [63–99]	0.13
Protein (day 1 g/l)	54 ± 12	54 ± 13	54 ± 10	0.84
Lactates day 1 (mmol/l)	1.9 [1.3–2.3]	1.9 [1.3–2.6]	2.4 [1.3–3.2]	0.49

Values are frequencies (percentages), mean ± SD or medians [IQR]  
\* P value for comparison between sepsis and trauma patients  
<sup>a</sup> All these patients received statins

**Tableau 1** : Caractéristiques générales des patients.



**Figure 1** : Comparaison des profils lipidiques entre patients septiques et patients polytraumatisés.

<b>Table S1: sensitivity analysis in age/sex-matched patients</b>			
<b>Characteristics</b>	<b>Sepsis (n=16)</b>	<b>Trauma (n=16)</b>	<b>P *</b>
Age, years	55 [42-64]	54 [43-62]	0.94
Male	8 (50.0)	8 (50.0)	-
Weight, kg	66.5 [60.0-77.0]	88.5 [65.0-91.5]	0.047
ISS	-	29.0 [20.5-38.5]	-
SAPSI	37 [23-57]	40 [32-57]	0.35
SOFA day1	7 [5-9]	8 [6-9]	0.63
Norepinephrine day 1, µg/kg/min	0.3 [0.0-0.4]	0.1 [0.0-0.6]	1.00
Glasgow score day 1	15 [14-15]	13 [7-15]	0.017
Leucocytes/mm <sup>3</sup> day 1	17180 [9540-22520]	14210 [7165-18465]	0.53
Hematocrit day 1, %	33 [28-35]	34 [29-37]	0.71
Creatininemia day 1, mmol/l	80 [65-132]	95 [67-104]	0.64
Protein, day 1 g/L	56 [49-66]	53 [45-57]	0.25
Lactates day 1, mmol/l	1.8 [1.3-2.2]	2.8 [1.2-3.6]	0.25
TC, mmol/l	1.72 [1.51-3.53]	2.95 [2.24-4.13]	0.065
HDL-C, mmol/l	0.19 [0.14-0.92]	0.98 [0.70-1.30]	0.001
LDL-C, mmol/l	0.90 [0.57-1.92]	1.48 [1.08-2.16]	0.23
Triglycerides, mmol/l	1.40 [1.14-1.85]	0.87 [0.77-1.03]	0.009

**Tableau S1** : Comparaison des caractéristiques entre les deux groupes après appariement sur l'âge et le sexe.

### III. b Profil lipidique et sévérité du sepsis :

Chez les patients septiques, la sévérité du sepsis (mesurée par le score SOFA et le besoin en ventilation mécanique) était corrélée négativement avec la concentration en HDL-C alors qu'il n'y avait pas d'association avec la concentration en LDL-C ou en triglycérides. Nous avons trouvé une corrélation négative entre le score SOFA à l'admission et la concentration en HDL-C ( $r = -0,50$ ,  $p = 0,0004$ ). Les taux de HDL-C étaient plus bas chez les patients ventilés ( $0,21 \text{ mmol/l}$  [ $0,13-0,45$ ] versus  $0,52$  [ $0,25-0,96$ ],  $p = 0,029$ ). Ces résultats sont exprimés dans le Tableau 2.

	TC		LDL-C		HDL-C		Triglycerides	
	Values	P*	Values	P*	Values	P*	Values	P*
<i>Severity variables</i>								
SOFA score at day 1 <sup>2</sup>	-0.31	0.032	0.23	0.11	-0.50	0.0004	0.14	0.34
<i>Mechanical ventilation use<sup>1</sup></i>								
No (n = 23)	2.03 [1.53–3.56]	0.17	0.97 [0.66–2.20]	0.29	0.52 [0.25–0.96]	0.029	1.11 [0.79–1.32]	0.45
Yes (n = 27)	1.64 [1.38–2.55]		0.88 [0.68–1.36]		0.21 [0.13–0.45]		1.25 [0.62–1.57]	
Length of mechanical ventilation <sup>2</sup>	-0.20	0.17	-0.13	0.39	-0.39	0.006	0.23	0.11
<i>Bacterial species</i>								
<i>Gram-negative bacteria<sup>1</sup></i>								
No (n = 10)	2.04 [1.64–3.74]	0.55	1.11 [0.71–1.97]	0.88	0.48 [0.19–0.96]	0.53	1.37 [1.03–2.14]	0.68
Yes (n = 35)	2.03 [1.29–2.83]		0.95 [0.63–1.61]		0.30 [0.15–0.62]		1.25 [0.82–1.53]	
<i>Gram-positive cocci<sup>1</sup></i>								
No (n = 25)	1.81 [1.28–2.83]	0.37	0.93 [0.66–1.70]	0.83	0.21 [0.15–0.37]	0.013	1.32 [0.82–1.57]	0.57
Yes (n = 20)	2.07 [1.64–3.24]		0.97 [0.71–1.56]		0.61 [0.25–1.01]		1.24 [0.90–1.41]	
<i>Prognosis variables</i>								
<i>Mortality in ICU<sup>1</sup></i>								
No (n = 40)	2.11 [1.56–3.17]	0.28	0.96 [0.70–1.66]	0.44	0.35 [0.17–0.83]	0.68	1.20 [0.81–1.56]	0.26
Yes (n = 10)	1.67 [1.26–2.11]		0.78 [0.42–1.36]		0.21 [0.17–0.55]		1.22 [0.44–1.32]	
Length of stay in ICU <sup>2</sup>	-0.21	0.21	-0.31	0.055	-0.35	0.030	0.21	0.20
<i>SOFA score &gt;6 or died at day 3<sup>1</sup></i>								
No (n = 29)	2.40 [1.60–3.19]	0.003	1.03 [0.68–1.86]	0.013	0.35 [0.19–0.86]	0.033	1.25 [0.88–1.53]	0.078
Yes (n = 15)	1.53 [1.09–2.11]		0.77 [0.42–0.99]		0.20 [0.11–0.41]		0.79 [0.44–1.32]	
<i>SOFA score &gt;6 or died at day 7<sup>1</sup></i>								
No (n = 15)	1.64 [1.52–2.55]	0.43	0.85 [0.67–1.03]	0.68	0.30 [0.11–0.78]	0.20	1.09 [0.79–1.57]	0.93
Yes (n = 13)	1.62 [1.28–2.11]		0.87 [0.42–1.26]		0.17 [0.12–0.37]		1.25 [0.61–1.53]	

**Tableau 2 :** Associations entre les profils lipidiques et la sévérité et le pronostic des patients septiques

### III. c Profil lipidique et devenir des patients :

Alors que la mortalité en réanimation n'était pas associée aux concentrations des lipoprotéines (Tableau 2), une corrélation négative a été mise en évidence entre la concentration en HDL-C et la durée de séjour en réanimation ( $r = -0,35$ ,  $p = 0,03$ ) dans le groupe de patients survivants à la sortie de réanimation.

De plus, les patients ayant une évolution péjorative définie comme étant le décès ou un score SOFA > 6 à J3, avaient un niveau de HDL-C plus bas que les autres (0,20 mmol/l [0,11-0,41] versus 0,35 [0,19-0,86],  $p = 0,03$ ).

### III. d Profil lipidique et espèce bactérienne :

Dans le sous-groupe de patients septiques, aucune association n'a été trouvée entre la présence de bactéries à Gram négatif et le profil lipidique (table 2), alors que la présence de bactéries à Gram positif était associée à une concentration en HDL-C plus élevée (0,61 mmol/l [0,25-1,01] versus 0,21 [0,15-0,37],  $p = 0,013$ ).

### III. e Profil lipidique dans le sous-groupe de patients traumatisés :

Hormis la durée de ventilation mécanique, nous n'avons pas trouvé de lien statistique entre le profil lipidique et le devenir ou les caractéristiques des patients traumatisés. Ces résultats sont présentés dans le Tableau S2.

	TC		LDL-C		HDL-C		Triglycerides	
	Values	P*	Values	P*	Values	P*	Values	P*
SOFA score at day 1 <sup>2</sup>	-0.34	0.11	-0.24	0.29	-0.37	0.085	0.07	0.75
Mechanical ventilation use <sup>1</sup>								
No (n=5)	3.39 [2.48-4.78]	-	1.82 [0.98-2.20]	-	1.03 [0.98-1.40]	-	0.86 [0.66-1.02]	-
Yes (n=20)	2.70 [2.16-3.58]	-	1.20 [0.87-2.04]	-	0.99 [0.70-1.23]	-	0.84 [0.71-1.05]	-
Length of mechanical ventilation <sup>2</sup>	-0.25	0.25	-0.23	0.30	-0.22	0.31	0.29	0.17
Mortality in ICU <sup>1</sup>								
No (n=23)	2.81 [2.19-3.82]	-	1.32 [0.98-2.04]	-	0.99 [0.74-1.28]	-	0.81 [0.66-1.02]	-
Yes (n=2)	1.35-4.44	-	0.07-2.11	-	0.56-1.87	-	1.03-1.59	-
Length of stay in ICU <sup>2</sup>	-0.60	0.004	-0.46	0.042	-0.52	0.016	0.05	0.85

Values are median of lipid levels reported in mmol/l [IQR] or partial Spearman's correlation coefficients.  
\* age-sex-adjusted P Values (<sup>1</sup> no comparison because of small number of events (≤5); <sup>2</sup> calculated using partial Spearman's rank correlation)

**Tableau S2 :** Associations entre les profils lipidiques et la sévérité et le pronostic des patients traumatisés



#### IV. Discussion

Dans cette étude, nous avons donc montré que la concentration de HDL-C était basse au cours du sepsis alors qu'elle n'était pas modifiée au cours du trauma. Par ailleurs, dans le groupe de patients septiques, nous n'avons pas trouvé d'association entre la concentration de HDL-C et la mortalité. Le score SOFA, le besoin en ventilation mécanique et la durée de séjour était corrélés négativement avec le niveau de HDL.

Cette diminution drastique de la concentration de HDL-C due possiblement à une consommation accrue, une fuite capillaire massive et une dysfonction hépatique, peut également être expliquée par la captation et l'élimination du LPS par cette particule. En effet, après sa liaison avec ce composé, une augmentation de leur élimination pourrait expliquer cette diminution de particules de HDL en condition septique (208,212).

Alors que le sepsis et le trauma sont deux entités où l'inflammation est exacerbée, avec en particulier une activation disproportionnée de signaux pro-inflammatoires et l'action d'un certain nombre de médiateurs du soi (312,315,316), nous n'avons pas retrouvé les mêmes profils lipidiques. Il s'agit à notre connaissance de la première étude comparant les profils lipidiques de ces deux pathologies. Les causes pouvant expliquer ces différences demeurent inconnues mais néanmoins l'interaction entre les particules de HDL et le LPS menant à leur clairance au cours du sepsis peut être une des causes.

Cette différence majeure entre ces deux pathologies met en relief le potentiel rôle protecteur des HDL au cours du sepsis. Ainsi, cette consommation accrue et l'élimination de ces particules de HDL a possiblement pour conséquence un moindre effet protecteur au cours du sepsis de ces HDL ayant de nombreuses propriétés endothélio-protectrices comme précédemment décrit (259,317).

Cependant, contrairement à un certain nombre d'études, nous n'avons pas retrouvé de lien statistique entre le niveau de HDL et la mortalité. Le faible nombre de patient inclus peut expliquer cette différence.

Notre travail comporte des limites :

- il y a une différence d'âge entre les patients septiques et les patients traumatisés grave. Néanmoins, une analyse de sensibilité en appariant l'âge et le sexe de patients des deux groupes a permis de retrouver les mêmes différences. De plus, de nombreuses études ne retrouvait pas de différence concernant le niveau de HDL entre les patients jeunes et les plus âgés (318–321).
- deuxièmement, nous n'avons pas mesuré dans notre étude de marqueurs de l'inflammation tels que certaines cytokines, ce qui ne permettait pas de comparer les patients en fonction de leur état inflammatoire. Néanmoins, nous n'avons pas trouvé de différence en terme de gravité entre les deux populations avec des scores IGSII et SOFA similaires.
- Troisièmement, nous n'avons pas évalué la cinétique des lipoprotéines au cours du temps.
- Enfin, l'absence de lien statistique entre la concentration de HDL-C et le devenir des patients et en particulier le décès nous encourage à réaliser une étude avec un nombre plus important de patients.



## **Partie 2. Modifications de taille des HDL au cours du choc septique. Résultats de l'étude LIPOSEP**

*Cf annexe : Tanaka et al. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. Annals of Intensive Care. 2019*

### **I. Etat des connaissances :**

Dans le domaine cardiovasculaire, la concentration en HDL-C et la taille des particules sont indépendamment associés au risque cardiovasculaire (287). En particulier, dans certaines études, les HDL de grande taille semblaient protéger la survenue de pathologie coronarienne (322,323). L'inverse a également été décrit (289). A notre connaissance, la taille des HDL n'a jamais été explorée au cours du sepsis.

Comme décrit précédemment, nous avons montré dans la partie 1 que la concentration de HDL était basse chez les patients septiques alors qu'elle était normale chez les traumatisés. Dans ce contexte, les propriétés anti-inflammatoires des HDL et leur capacité à limiter l'activation endothéliale sont ainsi drastiquement altérés au cours du sepsis.

Notre hypothèse de travail repose sur le fait qu'en plus de la diminution de la concentration des HDL, la taille des particules peut aussi être modifiée en condition septique. L'objectif de ce travail était de caractériser la concentration et la taille des HDL chez des patients hospitalisés en réanimation pour choc septique.

## **II. Méthodes :**

### **II. a Patients :**

L'étude a été réalisée dans le service de réanimation chirurgicale de l'hôpital universitaire de Bicêtre. Tous les patients admis dans la réanimation ont été inclus dans cette étude observationnelle dès lors qu'ils étaient en choc septique selon les définitions de la "surviving sepsis campaign". Cette étude a été approuvée par notre comité d'éthique local (comités de protection des personnes de l'université Paris VII numéro SC 13-026) qui n'a pas retenu l'indication à un consentement de par la nature observationnelle de ce travail. Au cours de la période d'inclusion, tous les patients non septiques hospitalisés en réanimation ont été inclus de manière prospective. Les diagnostics principaux de ce groupe contrôle étaient des traumatismes graves, des chocs hémorragiques, des traumatismes crâniens ou des hémorragies intra-cérébrales. Les patients immunodéprimés et les patients cirrhotiques ont été exclus de l'étude.

En accord avec nos procédures locales, la nutrition entérale précoce était toujours privilégiée. Si cette voie était impossible, une alimentation parentérale était administrée puis changée secondairement dès que possible pour une alimentation entérale. Certains patients pouvaient recevoir momentanément ces deux types de nutrition en même temps.

### **II. b Recueil des données**

Les données démographiques étaient colligées dès l'admission du patient (âge, sexe, IGSII, score SOFA, poids, antécédents). Le diagnostic d'hyperlipémie était défini comme une augmentation du cholestérol total plus ou moins associé avec une augmentation des triglycérides plasmatiques (324). Des prélèvements sanguins étaient réalisés à J1, J2 et J7

après l'admission afin de mesurer les concentrations en cholestérol total, HDL-C, LDL-C et triglycérides.

### **II.c Détermination des profils électrophorétiques des HDL par Lipoprint® (Quantimetrix)**

Les profils de taille des HDL ont été obtenus en utilisant la technologie Lipoprint® (Quantimetrix, distribué par Eurobio, France). La séparation des sous-fractions des HDL plasmatiques a été réalisée en utilisant une électrophorèse non-dénaturante. Des tubes contenant un gel à 8,5% de polyacrylamide ont été utilisés. En bref, 40µl d'échantillon a été mélangés avec 300µl de gel de concentration. Ce mélange a été ajouté au niveau du sommet de ces tubes de gel afin de réaliser une photopolymérisation à température ambiante durant 30 minutes. Puis une électrophorèse des gels contenant les échantillons a été effectuée (pendant 54 minutes à raison de 3mA par gel). A la fin de l'électrophorèse, les gels sont laissés pendant 30 minutes à température ambiante puis scannée (ScanMaker 8700 digital scanner Mikrotek® Co USA). L'analyse a ensuite été faite en utilisant le logiciel lipoware®.

### **II. d Détermination des concentrations d'Apolipoprotéine A-1 par méthode ELISA**

La concentration plasmatique d'ApoA-1 a été déterminée en utilisant un kit commercial (Mabtech®, Sweden). La procédure entière a été faite à température ambiante. La plaque ELISA a été recouverte toute une nuit avec un anticorps anti-ApoA-I dilué dans du PBS (2µg/ml). La plaque a été lavée 2 fois avec du PBS puis bloquée en ajoutant 150µl par puits de tampon de lavage de transfert PBS Tween®20 contenant 0,05% de Tween et 0,1% de BSA. Après 1h, 5 lavages consécutifs ont été réalisés avec du tampon de lavage de transfert. 100µl par puits de plasma de patient dilué (1 :100 000) ont été incubés pendant 2 heures ainsi qu'une gamme étalon allant de 0 à 50 ng/ml. Un lavage comme décrit

précédemment a été fait. Ensuite, 100µl par puits d'anticorps anti-ApoA-I lié à de la biotine à 0,5µl/ml ont été ajoutés puis incubés pendant 1 heure suivi d'un nouveau lavage. De la Streptavidine-HRP diluée au 1 :1 000 dans un tampon d'incubation a été secondairement ajouté (100µl/puit). Après une heure d'incubation suivie de 5 lavages, 100µl du substrat ont été ajoutés dans chaque puits. Après 5 minutes, la colorimétrie a été arrêtée en ajoutant 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M). La densité optique était mesurée à 405nm.

## **II. e Méthode ELISA LPS Binding Protein (LBP)**

Les concentrations de LBP ont été mesurées en utilisant un kit commercial ELISA (Cell Sciences Inc). Les échantillons ont été dilués au 1 :1000 et l'analyse a été faite selon la procédure préconisée par le fabricant avec une gamme d'étalonnage allant de 5 à 50 µg/ml.

## **II. f Quantification de l'ADN libre circulant (cf-DNA)**

La détermination de la quantité de cf-DNA dans le plasma des patients a été réalisée en utilisant le kit Quantit© Picogreen dsDNA Reagent (Life technologies©, France) (325).

## **II. g Détermination des taux de cytokines par méthode ELISA**

Tous les échantillons plasmatiques ont été dilués 4 fois avec un diluant Bio-Plex. 3 cytokines ont été analysées (IL-1b, IL-6, IL-8) en utilisant le kit Bio-Plex Pro© Human Cytokine Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

## **II. h Analyses statistiques**

Les variables continues ont été exprimées en médiane (IQR) et les variables catégorielles en fréquence (pourcentage). Ces dernières ont été comparées par un test de Chi-2 ou un test exact de Fisher. Les variables continues ont été comparées par un test de Mann-Whitney. Le Coefficient de Spearman a été calculé pour l'évaluation des corrélations. Pour tous les tests,  $p < 0,05$  était considéré significatif. Le logiciel Graphpad Prism 4.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) a été utilisé.



### III. Résultats

#### III. a Les patients

20 patients septiques et 20 patients non-septiques de réanimation ont été consécutivement inclus de manière prospective. Les caractéristiques démographiques des patients sont présentées dans le Tableau 1.

	<b>Septic shock (n = 20)</b>	<b>Control (n = 20)</b>	<b>P</b>
Age [years (Q1–Q3)]	68 (59.2–76.7)	70.5 (54.2–75.5)	0.65
Male [n (%)]	17 (85)	13 (65)	0.14
BMI [kg/m <sup>2</sup> (Q1–Q3)]	24.70 (20.2–28.6)	25 (20.2–30.5)	0.65
Dyslipidemia [n (%)]	5 (25)	3 (15)	0.69
Statin medication [n (%)]	3 (15)	0 (0)	0.23
SAPSI (Q1–Q3)	39 (29–59.5)	38 (30–51)	0.73
SOFA score (Q1–Q3)	8 (8–10)	6 (4–8)	<0.001
Mechanical ventilation [n (%)]	20 (100)	14 (70)	0.02
Need for norepinephrine [n (%)]	20 (100)	11 (55)	0.001
Norepinephrine (micg/kg/min)	0.42 (0.31–0.64)	0.12 (0.0–0.27)	<0.001
Enteral nutrition [n (%)]	12 (60)	18 (90)	0.065
Parenteral nutrition [n (%)]	5 (25)	2 (10)	0.41
Diagnosis at admission [n (%)]			
Peritonitis	10 (50)	–	–
Pneumonia	5 (25)	–	–
Cellulitis	2 (10)	–	–
Arthritis	1 (5)	–	–
Hepatic abscess	1 (5)	–	–
Trauma	–	6 (30)	–
Intracerebral hemorrhage	–	6 (30)	–
Traumatic brain injury	–	5 (25)	–
Hemorrhagic shock	–	2 (10)	–

Results are expressed as medians (IQR). Between-group differences were analyzed by a Mann–Whitney test, and a Chi-square test

**Tableau 1** : Données démographiques et cliniques des patients.

La plupart des patients en choc septique avaient une péritonite ou une pneumonie alors que les patients contrôles souffraient de traumatismes multiples, d'hémorragie intracérébrale ou de choc hémorragique. Le score SOFA des patients septiques était statistiquement plus élevé dans le groupe sepsis au sein duquel les patients recevaient davantage de noradrénaline ou bénéficiaient davantage de ventilation invasive. A part ces

paramètres, il n'y avait pas de différence significative entre les patients concernant les paramètres initiaux. En particulier, le score IGSII n'était pas différent entre les deux groupes. La concentration plasmatique de LBP était plus élevée chez les patients septiques à J1 (Tableau 2). L'activation des neutrophiles par du matériel bactérien peut entraîner la production de NETs (neutrophil extracellular traps) qui peuvent être détectés dans le plasma en mesurant les cf-DNA. Ce marqueur était également augmenté à J1 dans le groupe septique (Tableau 2).

	At day 1		At day 2		At day 7	
	Median or % (Q1–Q3)	<i>p</i>	Median or % (Q1–Q3)	<i>P</i>	Median or % (Q1–Q3)	<i>p</i>
Total serum proteins (g/L)						
Non-septic patients	64.5 (55.2–68.7)	0.16	60 (51–62)	0.01	62 (56.5–69.7)	0.06
Septic shock	55 (49.5–65.2)		50.5 (45.5–54.2)		57 (51–52.7)	
Leukocyte/mm <sup>3</sup>						
Non-septic patients	13,460 (8400–15,210)	0.53	11,270 (8630–13,790)	0.09	9070 (6970–12,200)	0.44
Septic shock	13,925 (9000–20,155)		13,945 (10,048–17,133)		10,290 (7910–15,670)	
Neutrophils/mm <sup>3</sup>						
Non-septic patients	10,710 (6318–13,895)	0.84	9640 (8605–11,565)	0.41	7620 (5033–12,833)	0.86
Septic shock	10,120 (6850–18,900)		12,475 (6958–15,788)		7490 (5870–12,425)	
LBP (µg/mL)						
Non-septic patients	39.3 (23.7–47.5)	< 0.001	44.3 (37.8–49.6)	0.09	46.6 (28.9–52.5)	0.45
Septic shock	47.9 (45–49.7)		48.9 (44.4–50.9)		48.8 (43.1–51.3)	
cf-DNA (ng/mL)						
Non-septic patients	582.1 (529.3–694.3)	< 0.0001	730.2 (571.8–806.5)	< 0.0001	866.6 (754.4–958.9)	0.84
Septic shock	980.9 (872.4–1323)		975.1 (841.6–1157)		835.8 (749.3–1023)	

Continuous variables are expressed as medians (interquartile range), and categorical variables are expressed as frequencies (percentages)  
A Mann–Whitney test was used for this analysis

**Tableau 2** : Données biologiques des patients à J1, J2 et J7.

Enfin, les patients en choc septique avaient des concentrations de cytokines plus élevées que les patients contrôles (IL-1 = 44,4pg/ml (20,6-86) versus 16,6pg/ml (9,9-29),  $p=0,016$  ; IL-6 = 3363pg/ml (1069-13968) versus 317pg/ml (118-604),  $p<0,001$  ; IL-8= 357pg/ml (187-753) versus 89pg/ml (62-121),  $p<0,001$ ) (Figure S1).

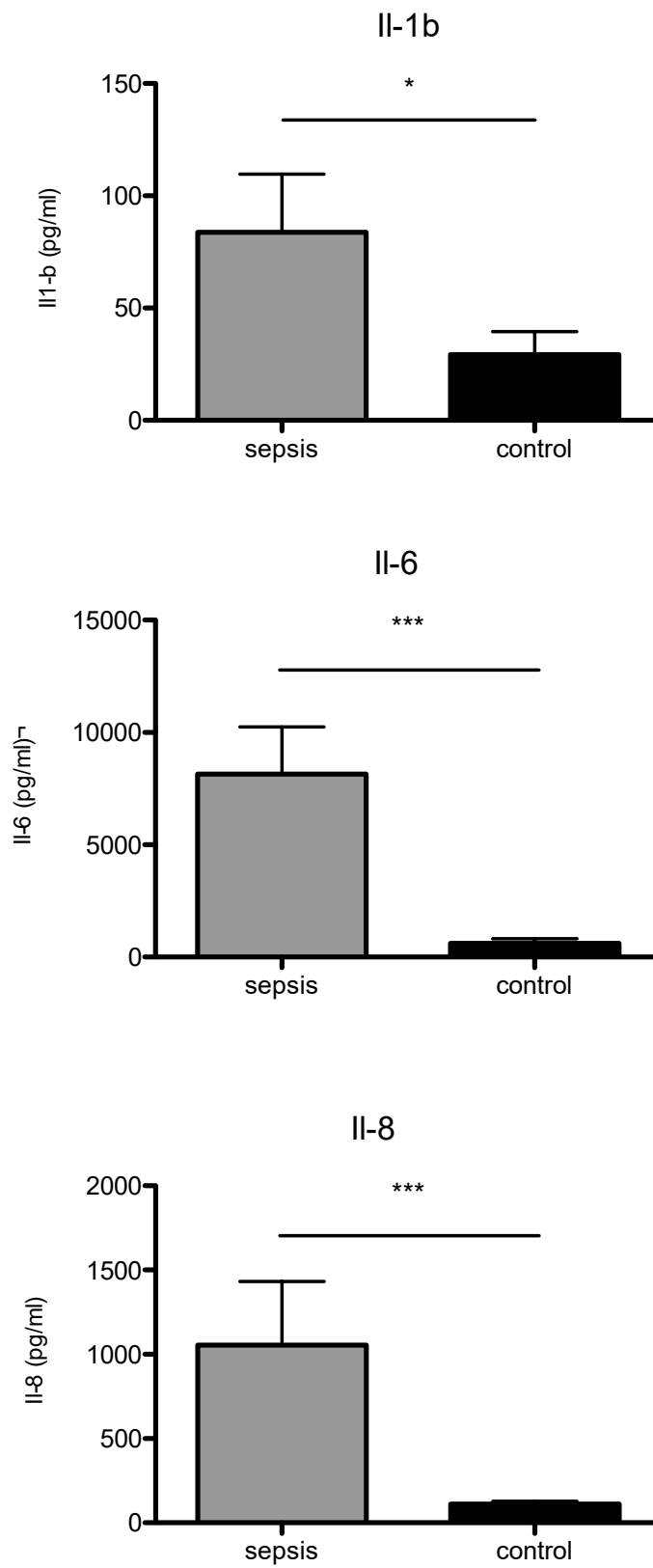


Figure S1: Concentration de cytokines à J1 (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

La mortalité était de 15% (n=3) dans le groupe septique et de 10% (n=2) dans le groupe de patients non-septiques au 7<sup>ème</sup> jour (p=1,0). A 28 jours, la mortalité était de 25% (n=5) dans le groupe septique et de 20% (n=4) dans le groupe non-septique (p=1,0).

### **III. b Profils lipidiques**

Les concentrations en cholestérol total, HDL-C et LDL-C étaient statistiquement plus basses dans le groupe sepsis à l'admission et à 48 heures (Tableau 3). La plus grande différence retrouvée concernait le HDL-C dont les concentrations étaient plus basses à l'admission, à J2 et à J7. Nous avons également regardé les associations entre les concentrations de HDL et des variables telles que le score SOFA, l'IGSII, la LBP ou le cf-DNA. A J1, des corrélations négatives ont été observées entre les concentrations de HDL et celles du cf-DNA ( $r=-0,74$ ,  $p<0,0001$ ) ainsi que celle du LBP ( $r=-0,31$ ,  $p=0,004$ ) mais pas avec les score SOFA et IGSII. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la concentration de HDL-C et le devenir du patient (mortalité, durée de séjour en réanimation) aussi bien dans le groupe septique que contrôle.

<b>Table 3 Lipid parameters in septic patients and controls</b>			
<b>Lipid profile at day 1</b>	<b>Septic shock (n = 20)</b>	<b>Non-septic patients (n = 20)</b>	<b>p</b>
Total cholesterol, mmol/l	2.1 [1.6–2.7]	4.0 [3.1–4.8]	<0.0001
mg/dl	82 [62–105]	156 [121–187]	
LDL-C, mmol/l	1.0 [0.8–1.6]	2.3 [1.4–2.9]	0.001
mg/dl	39 [31–62]	89 [54–112]	
HDL-C (mmol/l)	0.4 [0.3–0.7]	1.3 [1.0–1.5]	<0.0001
mg/dl	15 [12–27]	50 [39–58]	
Triglycerides, mmol/l	0.9 [0.7–1.7]	1.0 [0.7–1.2]	0.69
mg/dl	80 [62–150]	88 [62–106]	
Apolipoprotein-A1, mg/l	916 [315–2543]	2482 [1428–5518]	0.05
<b>Lipid profile at day 2</b>	<b>Septic shock (n = 18)</b>	<b>Non-septic patients (n = 19)</b>	<b>p</b>
Total cholesterol, mmol/l	1.8 [1.2–2.9]	3.2 [2.7–3.9]	0.001
mg/dl	70 [47–113]	125 [105–152]	
LDL-C, mmol/l	0.9 [0.4–1.5]	1.5 [1.1–2.2]	0.02
mg/dl	35 [15–58]	58 [43–86]	
HDL-C, mmol/l	0.3 [0.2–0.6]	1.0 [0.9–1.4]	<0.0001
mg/dl	12 [8–24]	39 [35–54]	
Triglycerides, mmol/l	1.4 [0.9–1.7]	1.0 [0.8–1.1]	0.16
mg/dl	124 [80–150]	88 [71–97]	
Apolipoprotein-A1, mg/l	787 [357–2234]	1562 [965–3101]	0.22
<b>Lipid profile at day 7</b>	<b>Septic shock (n = 15)</b>	<b>Non-septic patients (n = 12)</b>	<b>p</b>
Total cholesterol, mmol/l	2.7 [1.7–3.5]	3.4 [2.2–3.8]	0.29
mg/dl	105 [66–136]	132 [86–148]	
LDL-C, mmol/l	1.5 [0.9–2.0]	1.8 [1.4–2.5]	0.38
mg/dl	58 [35–77]	70 [54–97]	
HDL-C, mmol/l	0.4 [0.3–0.6]	0.7 [0.5–1.2]	0.04
mg/dl	15 [12–24]	27 [19–46]	
Triglycerides, mmol/l	1.3 [1.1–1.6]	1.0 [0.9–1.5]	0.25
mg/dl	115 [97–142]	88 [80–133]	
Apolipoprotein-A1, mg/l	1340 [391–1922]	962 [508–3752]	0.98

Results are expressed as medians (IQR). The statistical differences were analyzed by a Mann–Whitney test

**Tableau 3** : Profils lipidiques des patients à J1, J2 et J7.

### III.c Analyse de la taille des particules de HDL par Lipoprint

Une modification majeure de la distribution des particules de HDL a été observée entre les patients septiques et non-septiques. Une diminution statistiquement significative des petites et moyennes fractions avec en parallèle une augmentation de particules de grande taille ont été observées à l'admission et à 48h chez les patients en choc septique (Figure 1). A J7, les patients septiques présentaient un profil de HDL similaire à celui des patients contrôles (Figure 1). Ainsi, en plus de la diminution drastique de la concentration de

HDL-C, les particules de HDL sont plus grandes chez les patients septiques en comparaison avec les non-septiques.

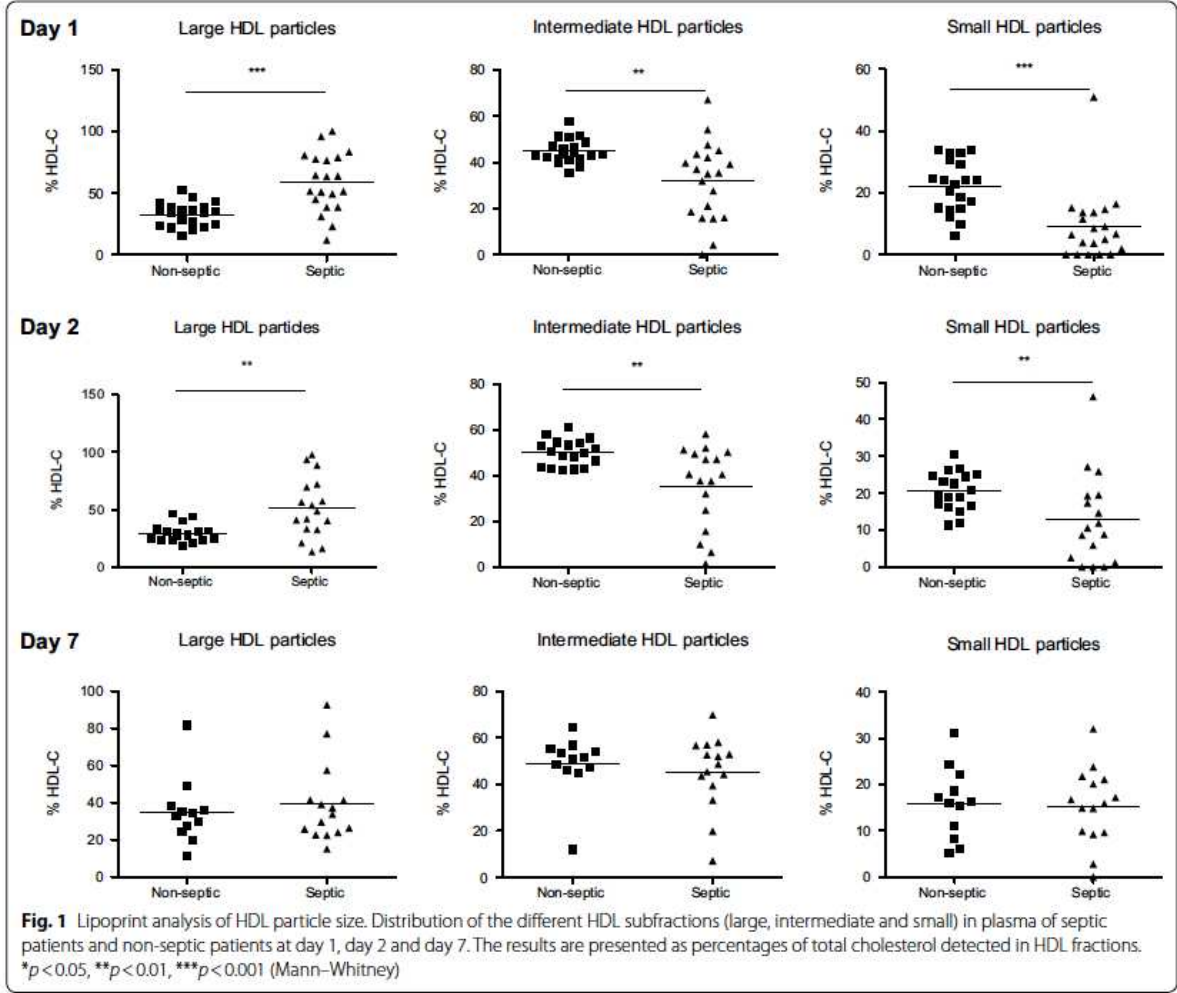
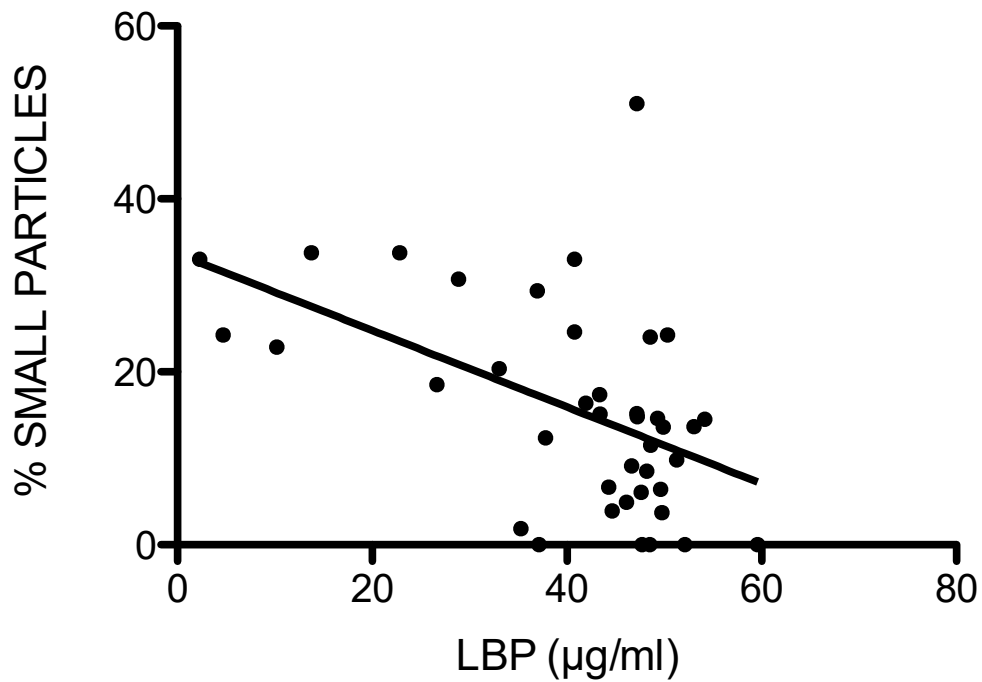
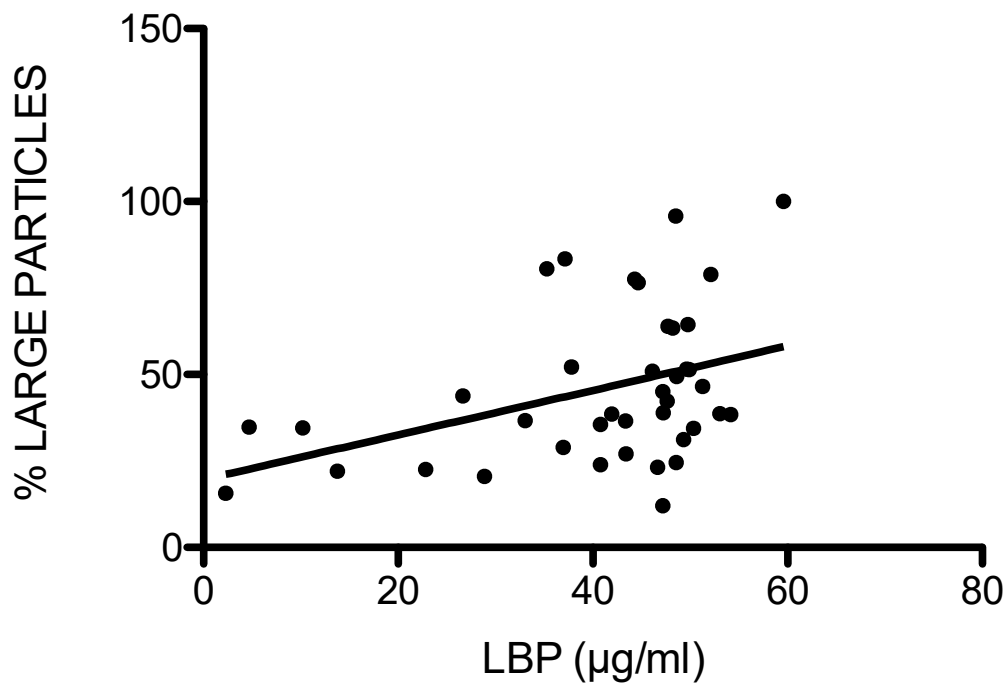


Figure 1 : Taille des HDL à J1, J2 et J7 en fonction des groupes.

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la taille des HDL à J1, J2 et J7 et le devenir des patients (mortalité, durée de séjour en réanimation) que cela soit chez les patients septiques ou les patients contrôles. Il y avait néanmoins une corrélation positive entre le pourcentage de particules de grande taille à J1 et la concentration de LBP ( $r=0,39$ ,  $p=0,012$ ) et une corrélation négative entre le pourcentage de particules de petites tailles à J1 et la concentration de LBP ( $r=-0,5$ ,  $p=0,001$ ) (Figure S2). Aucune corrélation entre les tailles de HDL et la LBP n'a été retrouvée à J2 ou J7.



**Figure S2:** Corrélation entre le pourcentage de particules de HDL de petite et de grande taille et la concentration de LBP à J1.



#### IV. Discussion

Dans ce travail, nous avons donc montré qu'en comparant deux populations inflammatoires de réanimation ayant des scores de gravité similaires, les patients septiques avaient des concentrations de HDL-C plus basses que les patients contrôles et que les particules de HDL étaient plus grosses que celles des patients contrôles. Ce dernier point est particulièrement intéressant car les petites particules de HDL sont généralement considérées comme fonctionnelles. Ainsi, au cours du sepsis, il semble y avoir non seulement davantage de grosses particules non fonctionnelles mais aussi une diminution drastique de la concentration de HDL-C. A notre connaissance, il s'agit de la première étude retrouvant cette modification de taille au cours du choc septique. En accord avec nos résultats, De la Llera-Moya *et al.* ont montré qu'un épisode d'endotoxémie induit par une injection de LPS chez des volontaires sains entraînait une diminution des particules de HDL pré- $\beta$  et celles de petite et de moyenne taille dans une évaluation par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (268). Dans un certain nombre de pathologies cardiovasculaires, il a été démontré que les petites particules de HDL avaient des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires plus prononcées que les autres (317). Néanmoins, toujours au cours de ces pathologies inflammatoires chroniques, l'effet protecteur relatif à la taille de ces particules demeure controversé : il a été par exemple démontré que les particules plus grosses étaient associées à moins d'évènements coronariens (323,326) mais d'autres études ont démontré l'inverse (289).

Nous pouvons évoquer plusieurs hypothèses pouvant expliquer ces modifications :

- Premièrement, l'interaction entre les particules de HDL et le LPS (ou le LTA) pourrait entraîner une modification de taille des HDL et ainsi en modifier les fonctions.

- Deuxièmement, le sepsis et son état pro-coagulant pourrait entraîner une agrégation des particules de HDL participant ainsi à l'augmentation de taille des HDL.
- Troisièmement, le sepsis va entraîner une diminution des capacités des HDL à induire un efflux de cholestérol. La dysfonction d'ABCA-1 pourrait ainsi engendrer une diminution de la synthèse des petites particules pré- $\beta$ . De plus, la diminution de SRB-1 observée en condition inflammatoire pourrait également participer à l'augmentation de la proportion des particules plus grosses telles de HDL-2 ou HDL-3.
- Enfin, les conditions septiques augmentent l'association entre les particules de HDL et la Sérum Amyloïde A (SAA) pouvant ainsi accroître de manière indirecte la taille.

Notre étude comporte certaines limites :

- Tout d'abord, il s'agit d'une étude monocentrique avec un nombre restreint de patients. Néanmoins, malgré ce faible nombre de patients, nous avons pu montrer une différence significative entre les groupes.
- Deuxièmement, notre étude s'est intéressée à une seule technique afin d'évaluer la taille des particules de HDL, celle du Lipoprint®. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire aurait pu être également utilisée.
- Troisièmement, les patients septiques recevaient davantage de noradrénaline par rapport aux patients non-septiques, ce qui peut être un biais. La noradrénaline stimule l'expression de la lipoprotéine lipase qui intervient dans le métabolisme des lipides en hydrolysant les triglycérides contenus dans les chylomicrons et les VLDL. Cette stimulation peut ainsi participer aux modifications des profils lipidiques en condition septique.
- Enfin, nous n'avons pas décrit de mécanisme dans notre étude pour expliquer ces modifications de taille.



### **Partie 3. Evolution des profils lipidiques au cours du temps chez des patients septiques hospitalisés en réanimation : résultats de l'étude HIGH-SEPS**

#### **I. Etat des connaissances :**

Un grand nombre d'études observationnelles au cours du sepsis a mis en relief une corrélation négative entre la concentration de HDL-C et la mortalité (252–254,327).

Néanmoins, quelques études n'ont pas retrouvé ce lien statistique entre concentration basse de HDL et mortalité (251,257,261). Ces résultats négatifs demeurent néanmoins très minoritaires par rapport aux nombreuses études montrant un lien fort entre concentration de HDL-C et mortalité.

La concentration de HDL-C était également associée à la morbidité dans de nombreuses études (257,262,263). Dans la partie 1, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la concentration de HDL à l'entrée en réanimation et la mortalité. Néanmoins, une corrélation négative a été mise en évidence entre la concentration en HDL et la durée de séjour en réanimation ( $r = -0,35$ ,  $p = 0,03$ ) dans le groupe de patients survivants à la sortie de réanimation. De plus, les patients ayant une évolution péjorative définie comme étant le décès ou un score SOFA > 6 à J3, avaient un niveau de HDL-C plus bas que les autres (0,20 mmol/l [0,11-0,41] versus 0,35 [0,19-0,86],  $p = 0,03$ ).

Objectifs de l'étude : les résultats controversés des études citées précédemment sur le lien entre la mortalité et la concentration de HDL-C nous ont poussé à réaliser une étude prospective observationnelle dans notre service de réanimation chirurgicale afin de caractériser le profil lipidique de patients septiques et *in fine* de rechercher un lien statistique entre les concentrations des lipoprotéines et le devenir des patients. Le second objectif de ce travail était d'établir une cinétique des profils lipidiques au cours du temps

(admission, 48h et jour de sortie de réanimation). Quand cela était possible, un bilan lipidique basal réalisé avant l'hospitalisation était récupéré.

## **II. Méthodes**

### **II. a Méthodologie de l'étude et sélection des patients**

Il s'agissait d'une étude prospective, observationnelle monocentrique réalisée dans le service de réanimation chirurgicale de l'hôpital universitaire Bichat Claude-Bernard. Les patients ont été recrutés de mai 2016 à avril 2019. Tout patient admis pour choc septique ou sepsis sévère selon les critères de la "Surviving Sepsis Campaign" ont été inclus (328). Les patients cirrhotiques ou immunodéprimés ont été exclus de l'étude. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique pour la recherche en anesthésie-réanimation (IRB 00010254). Cette étude a fait l'objet d'une demande à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (déclaration 2044477).

### **II. b Recueil des données :**

Les caractéristiques démographiques des patients, le diagnostic, les scores de gravité IGSII et SOFA, et les données cliniques ont été recueillis de manière prospective. Les données concernant le site de l'infection et le type de bactérie ont été également collectés. La mortalité en réanimation et hospitalière à 28 jours, 3 mois et 1 an, la durée de ventilation mécanique, le nombre de jours vivant sans ventilation mécanique à J28, la durée de séjour en réanimation et à l'hôpital, le score KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcome) maximal au cours du séjour, le recours à la dialyse et aux vasopresseurs, le score SOFA à l'admission, à 48h et le jour de la sortie ont été recueillis. A l'admission (J1), à 48h (J3) et le jour de la sortie, les concentrations plasmatiques de cholestérol total, HDL-C, LDL-C, et

triglycérides ont été recueillies. Les données du ionogramme sanguin et de la numération formule sanguine d'entrée ont été également colligées. Ces analyses ont été effectuées dans le laboratoire de l'hôpital Bichat. Les concentrations de cholestérol total, HDL-C et triglycérides ont été déterminées par une méthode enzymatique de routine (analyser Bayer ADVIA 1650) et le LDL-C a été calculé en utilisant l'équation de Friedwald. Les concentrations standard de l'hôpital Bichat étaient : LDL-C :  $N < 4,2 \text{ mmol/l}$  ; HDL-C :  $1,0 < N < 2,0 \text{ mmol/l}$  ; cholestérol total  $3,4 < N < 6,2 \text{ mmol/l}$  et triglycérides :  $0,45 < N < 1,7 \text{ mmol/l}$ .

Quand un patient a été inclus dans l'étude, le médecin en charge du patient a demandé au patient lui-même ou à sa personne de confiance si un bilan lipidique complet avait été réalisé dans les 2 ans avant l'hospitalisation du patient en réanimation. Ce bilan devait être réalisé en dehors de tout épisode infectieux. S'il avait été réalisé, ce bilan lipidique était alors considéré comme le bilan lipidique basal (bilan antérieur).

## II. c Analyse statistique :

Les variables catégorielles ont été comparées à l'aide du test du Khi-deux ou du test exact de Fisher. Les variables continues ont été comparées à l'aide du test t de Student (pour les données paramétriques) ou de Mann Whitney (pour les données non paramétriques), selon les cas. Les mesures répétées ont été comparées à l'aide du test de Friedman.

Les variables continues ont été comparées entre elles à l'aide du coefficient de Spearman.

Les performances des lipoprotéines pour prédire la mortalité à J28 et la combinaison d'un SOFA > 6 ou d'un décès à J3 ont été représentées à l'aides de courbes de ROC.

Enfin, un modèle multivarié de régression logistique a été utilisé pour évaluer les facteurs associés à la mortalité à J28 .

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de la version 15 de STATA (StataCorp LP, College Station, TX) et de Graphpad Prism 4.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

### **III. Résultats**

#### **III. a Population**

205 patients septiques ont été inclus consécutivement et de manière prospective entre mai 2016 et avril 2019. Les hommes représentaient 52% de l'effectif, l'âge médian était de 63 (52-73) ans. Concernant les scores de gravité à l'admission, l'IGSII médian et le SOFA médian était respectivement de 57 (40-68) et de 7 (4-9).

La médiane de la durée de séjour en réanimation était de 7 (3-16) jours, la durée de ventilation mécanique était de 2 (0-8) jours. La mortalité en réanimation était de 17%. La mortalité à 28 jours était également de 17%. La mortalité à 3 mois était de 24%. La mortalité à un an n'a pu être calculée compte-tenu du manque de recul de l'analyse (fin d'analyse prévue pour avril 2020).

Le Tableau 1 représente les caractéristiques générales des patients inclus.



Caractéristiques	Tous les patients (n=205)	Patients décédés à 28 jours (n=35)	Patients vivants à 28 jours (n=170)	p
Sexe masculin (%)	52%	60%	51%	0,3595
Age (années)	63 (52-73)	67 (62-77)	63 (51-72)	0,0208
Poids (kg)	75 (64-90)	70 (60-86)	78 (65-90)	0,1593
Statine (%)	31%	22%	32%	0,3183
KDIGO maximal	1 (0-3)	3 (2-3)	1 (0-2)	<0,0001
IGS2 J1	57 (40-68)	75 (64-89)	54 (38-63)	<0,0001
SOFA J1	7 (4-9)	10 (7-12)	6 (4-8)	<0,0001
Lactate J1 (mmol/l)	2,2 (1,4-3,4)	3,0 (2,0-5,3)	2,1 (1,3-3,3)	0,0002
Noradrénaline J1 (micg/kg/min)	0,23 (0,0-0,55)	0,66 (0,48-1,24)	0,18 (0,0-0,41)	<0,0001
EER J1 (%)	11%	26%	8%	0,0044
SOFA J3	4 (1-7)	11 (7-13)	3 (1-6)	<0,0001
Lactate J3 (mmol/l)	1,4 (1,0-1,9)	2,4 (1,8-6,9)	1,3 (0,9-1,8)	<0,0001
Noradrénaline J3 (micg/kg/min)	0,0 (0,0-0,24)	0,48 (0,25-0,91)	0,0 (0,0-0,1)	<0,0001
EER J3 (%)	12%	34%	8%	0,0001
SOFA sortie	0 (0-1)	-	0 (0-1)	-
Lactate sortie (mmol/l)	1,0 (0,8-1,5)	-	0,9 (0,8-1,2)	-
Noradrénaline sortie (micg/kg/min)	0 (0-0)	-	0 (0-0)	-
Durée de séjour en réanimation (jours)	7 (3-16)	6 (3-13)	7 (4-17)	0,0724
Durée de ventilation mécanique (VM, jours)	2 (0-8)	5 (2-12)	2 (0-7)	0,0007
Jours vivants sans VM à J28	26 (11-28)	0 (0-2)	26 (21-28)	<0,0001
Mortalité en réanimation (%)	17%	91%	2%	<0,0001
Mortalité à 28 jours (%)	17%	100%	0%	<0,0001

**Tableau 1** : Caractéristiques générales de la population. Stratification en fonction de la mortalité à J28 (test de Mann Whitney pour les variables continues, test exact de Fisher pour les variables catégorielles).

### III. b Etiologie des sepsis et microbiologie

73% des patients présentaient un choc septique et 27% un sepsis sévère. Une bactériémie était constatée dans 26% des cas. 48% des patients avaient une infection polymicrobienne. Concernant l'étiologie du sepsis, la majorité de notre effectif était des sepsis à point de départ digestif (42%), suivie des infections des voies urinaires (17%), de la peau et des tissus mous (17%), puis les infections pleuro-pulmonaires (14%). Les autres sepsis représentaient 10% de l'effectif. Le Tableau 2 met en relief ces caractéristiques. Hormis une augmentation de la mortalité à J28 dans le sous-groupe de patients ayant un choc septique par rapport au sepsis sévère, aucune différence en terme de mortalité à J28 n'a été rapportée.

	Tous les patients n=205	Patients décédés à 28 jours n=35	Patients vivants à 28 jours n=170	p
<b>Choc septique</b>	149/205 = 73%	33/149 = 22%	116/149 = 78%	0,0008
<b>Sepsis sévère</b>	56/205 = 27%	2/56 = 4%	54/56 = 96%	<0,0001
<b>Bactériémie</b>	53/205 = 26%	12/53 = 23%	41/53 = 77%	0,1259
<b>Levures</b>	18/205 = 9%	3/18 = 17%	15/18 = 83%	1,0
<b>Infection plurimicrobienne</b>	99/205 = 48%	16/99 = 16%	83/99 = 84%	0,8530
<b>Sepsis intra-abdominal</b>	87/205 = 42%	16/87 = 18%	71/87 = 82%	0,7095
<b>Sepsis pleuro-pulmonaire</b>	29/205 = 14%	6/29 = 21%	23/29 = 79%	0,5960
<b>Sepsis des voies urinaires</b>	35/205 = 17%	3/35 = 9%	32/35 = 91%	0,2157
<b>Sepsis de la peau et des tissus mous</b>	35/205 = 17%	8/35 = 23%	27/35 = 77%	0,3280
<b>Autres sepsis</b>	19/205 = 10%	2/19 = 11%	17/19 = 89%	0,5397

**Tableau 2** : Type d'infection. Stratification en fonction de la mortalité à J28. Les comparaisons ont été réalisées avec un test exact de Fisher.

Plus de 50% des germes était des Bacilles Gram négatif avec une majorité d'entérobactéries. 38% était des Cocci Gram positif. Le Tableau 3 représente les espèces bactériennes représentées dans la cohorte de patients.

	Germes retrouvés chez tous les patients, n (%)	Patients décédés à J28	Patients vivants à J28	p
<b>Bacilles Gram négatif</b>	<b>191 (100%)</b>	<b>35</b>	<b>156</b>	<b>0,73</b>
<i>Escherichia coli</i>	77 (40%)	11	66	0,49
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22 (12%)	3	19	0,66
<i>Enterobacter aerogenes</i>	16 (8%)	4	12	0,39
<i>Bacteroides fragilis</i>	10 (5%)	3	7	0,27
<i>Enterobacter cloacae</i>	10 (5%)	2	8	0,80
<i>Proteus mirabilis</i>	9 (4.5%)	1	8	0,63
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 (4.5%)	3	5	0,12
Autres germes	39 (21%)	8	31	0,47
<b>Cocci Gram positif</b>	<b>140 (100%)</b>	<b>20</b>	<b>120</b>	<b>0,42</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	30 (21%)	5	25	0,95
<i>Staphylococcus aureus</i>	27 (19%)	5	22	0,83
<i>Streptococcus anginosus</i>	14 (10%)	1	13	0,32
<i>Streptococcus oralis</i>	10 (7%)	1	9	0,55
<i>Enterococcus faecium</i>	9 (6%)	3	6	0,19
Autres germes	50 (37%)	5	45	0,15
<b>Bacilles Gram positif</b>	<b>24</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>0,95</b>
<b>Cocci Gram négatif</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0,51</b>
<b>Levures</b>	<b>18</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>0,96</b>
Sepsis non documenté	19	5	14	0,23

**Tableau 3** : Microbiologie des patients inclus (test exact de Fisher).

### **III. c Concentration des lipoprotéines au cours du temps**

Le Tableau 4 représente les variations des lipoprotéines au cours du temps (J1 = admission ; J3=H48 et J sortie de réanimation). Sur les 205 patients inclus, 101 avaient un bilan antérieur réalisé en ville en dehors de tout processus infectieux (=bilan antérieur). Le délai médian de ce bilan antérieur par rapport à l'admission du patient en réanimation était de 10 (5-24) mois. Les patients décédés à 28 jours avaient une concentration de cholestérol total et de LDL à l'admission et à J3 statistiquement plus basse que les survivants. Aucune association n'a été mise en évidence entre mortalité et concentration de HDL dans notre cohorte.

	Tous les patients n=205	Patients décédés à 28 jours n=35	Patients vivants à 28 jours n=170	p
<b>Profil lipidique à J1 (mmol/l)</b>				
Cholestérol total	2,24 (1,7-2,78)	1,86 (1,47-2,41)	2,4 (1,84-2,84)	0,0058
HDL	0,44 (0,29-0,7)	0,31 (0,25-0,62)	0,46 (0,29-0,7)	0,1052
Triglycérides	1,53 (1,04-2,19)	1,41 (0,89-1,98)	1,53 (1,05-2,21)	0,4261
LDL	1,0 (0,58-1,50)	0,66 (0,45-1,17)	1,05 (0,64-1,55)	0,0096
<b>Profil lipidique à J3 (mmol/l)</b>				
Cholestérol total	2,31 (1,70-2,93)	1,85 (1,41-2,18)	2,46 (1,8-2,97)	0,0004
HDL	0,30 (0,25-0,48)	0,26 (0,23-0,42)	0,31 (0,25-0,50)	0,1176
Triglycérides	1,89 (1,37-2,76)	1,69 (1,38-1,92)	1,95 (1,37-2,87)	0,1151
LDL	1,04 (0,64-1,54)	0,71 (0,47-1,0)	1,12 (0,68-1,62)	0,001
<b>Profil lipidique J sortie (mmol/l)</b>				
Cholestérol total	2,93 (2,4-3,68)	-	2,56 (2,4-3,73)	-
HDL	0,65 (0,42-0,82)	-	0,65 (0,42-0,82)	-
Triglycérides	1,73 (1,3-2,39)	-	1,74 (1,3-2,46)	-
LDL	1,69 (1,26-2,21)	-	1,71 (1,26-2,21)	-
<b>Profil lipidique bilan antérieur (mmol/l)</b>				
Cholestérol total	4,65 (3,91-5,28)	5,08 (3,82-5,86)	4,65 (3,92-5,26)	0,4160
HDL	1,22 (1,04-1,57)	1,25 (1,08-1,48)	1,22 (1,03-1,96)	0,8125
Triglycérides	1,43 (0,90-2,03)	1,57 (1,11-2,2)	1,4 (0,88-1,96)	0,3955
LDL	2,7 (1,91-3,33)	2,45 (1,43-3,64)	2,7 (1,96-3,3)	0,8232

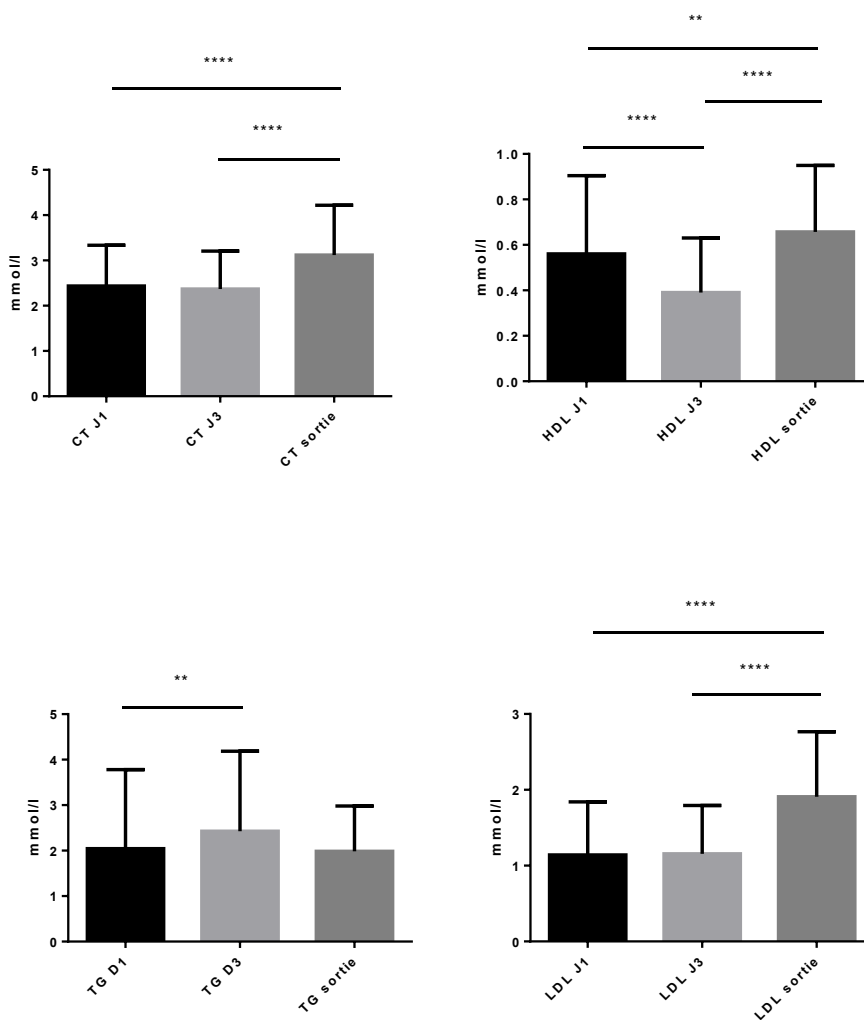
**Tableau 4** : Concentrations des lipoprotéines au cours du temps. Comparaison de ces concentrations en fonction de la mortalité à J28 (Test de Mann Whitney).

Une analyse comparant les concentrations de lipoprotéines au cours du temps en fonction du type de sepsis (sepsis sévère ou choc septique) a également été réalisée (tableau S1). Seules les concentrations de HDL et de LDL à J3 étaient statistiquement plus basses dans le sous-groupe choc septique par rapport au sous-groupe sepsis sévère (respectivement 0,28 (0,24-0,42) mmol/l vs 0,39 (0,26-0,63) mmol/l,  $p=0,0111$  et 0,96 (0,59-1,45) vs 1,32 (0,80-1,71),  $p= 0,0257$ ).

	Tous les patients N=205	Choc septique N=149	Sepsis sévère N=56	p
<b>Profil lipidique à J1 (mmol/l)</b>				
Cholestérol total	2,24 (1,7-2,78)	2,21 (1,63-2,86)	2,34 (1,90-2,72)	0,3739
HDL	0,44 (0,29-0,7)	0,40 (0,27-0,72)	0,46 (0,32-0,68)	0,4159
Triglycérides	1,53 (1,04-2,19)	1,66 (1,09-2,3)	1,44 (0,99-2,04)	0,1292
LDL	1,0 (0,58-1,50)	0,93 (0,52-1,48)	1,09 (0,82-1,56)	0,0599
<b>Profil lipidique à J3 (mmol/l)</b>				
Cholestérol total	2,31 (1,70-2,93)	2,23 (1,56-2,97)	2,52 (1,97-2,86)	0,2524
HDL	0,30 (0,25-0,48)	0,28 (0,24-0,42)	0,39 (0,26-0,63)	0,0111
Triglycérides	1,89 (1,37-2,76)	1,93 (1,41-2,79)	1,84 (1,29-2,57)	0,2656
LDL	1,04 (0,64-1,54)	0,96 (0,59-1,45)	1,32 (0,80-1,71)	0,0257
<b>Bilan lipidique J sortie (mmol/l)</b>				
Cholestérol total	2,93 (2,4-3,68)	3,06 (2,40-3,76)	2,73 (2,31-3,10)	0,1049
HDL	0,65 (0,42-0,82)	0,68 (0,40-0,85)	0,60 (0,46-0,72)	0,3580
Triglycérides	1,73 (1,3-2,39)	1,72 (1,3-2,44)	1,74 (1,31-2,26)	0,6343
LDL	1,69 (1,26-2,21)	1,70 (1,26-2,22)	1,50 (1,26-2,09)	0,6974
<b>Bilan lipidique bilan antérieur (mmol/l)</b>				
Cholestérol total	4,65 (3,91-5,28)	4,65 (3,91-5,29)	4,60 (3,95-5,27)	0,9511
HDL	1,22 (1,04-1,57)	1,25 (1,08-1,59)	1,20 (0,98-1,52)	0,5201
Triglycérides	1,43 (0,90-2,03)	1,47 (0,88-2,14)	1,38 (1,08-1,97)	0,8587
LDL	2,7 (1,91-3,33)	2,72 (1,86-3,32)	2,23 (1,96-3,4)	0,9165

**Tableau S1** : Concentrations de lipoprotéines au cours du temps en fonction du type de sepsis (sepsis sévère ou choc septique). Comparaisons réalisées en utilisant un Test de Mann Whitney.

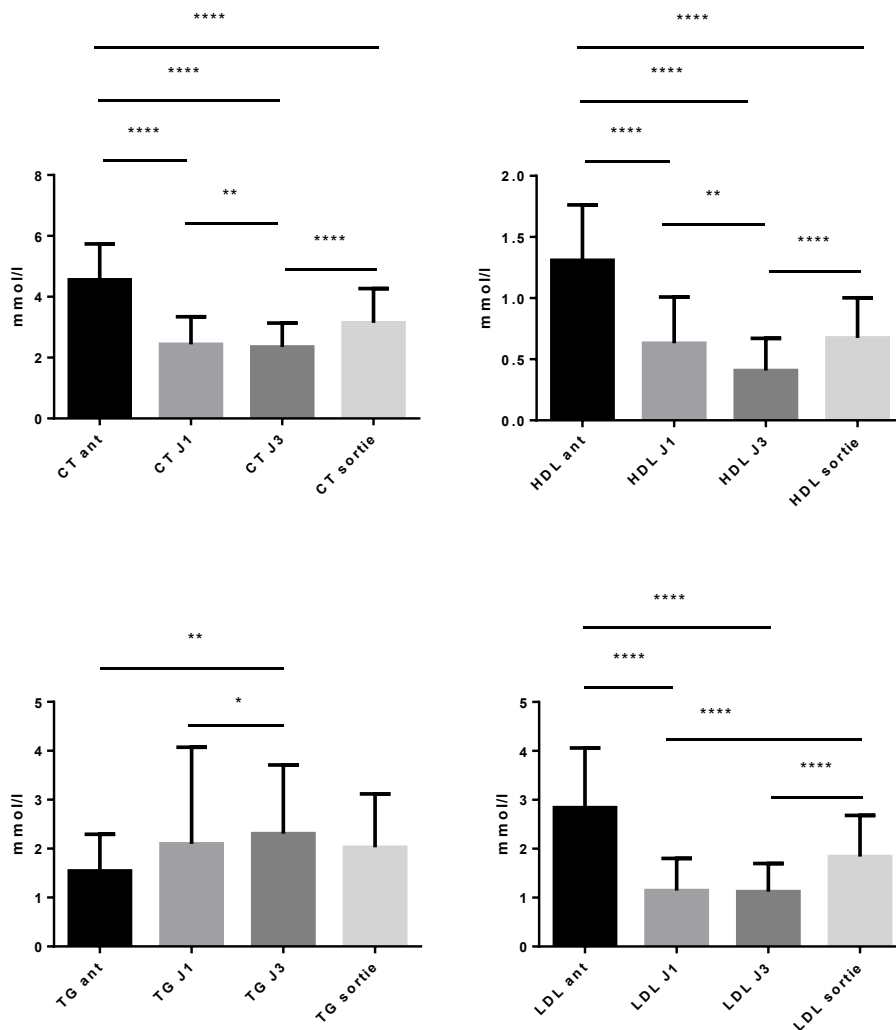
Les différences de variation de concentration des lipoprotéines ont été analysées (Figure 1). Afin de comparer les différents temps (J1, J3 et J sortie), un test de Friedman a été nécessaires avec mesures répétées. Compte-tenu de la présence de données manquantes (sortie de réanimation avant J3), l'analyse n'a pu inclure que 120 patients. Cette analyse a mis en exergue une diminution significative de la concentration de HDL-C de J1 à J3 et une augmentation statistiquement significative de la concentration le jour de la sortie par rapport à J3 mais aussi par rapport à J1.



**Figure 1** : Variations des concentrations en lipoprotéines, cholestérol total et triglycérides en fonction du temps (test de Friedman). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .



La Figure 2 représente les variations de concentrations de lipoprotéines en fonction du temps en tenant compte des valeurs antérieures à l'hospitalisation en réanimation. 66 patients ont pu ainsi être inclus dans l'analyse. En intégrant la concentration antérieure de HDL-C, l'analyse a pu mettre en évidence une diminution drastique de la concentration de HDL-C entre les valeurs antérieures et J1 suivie d'une diminution à J3. La concentration du jour de la sortie est plus élevée qu'à J3 sans atteindre le niveau de la concentration du bilan antérieur. Ces variations ont également été globalement retrouvées pour les valeurs de cholestérol total et pour celles des LDL-C.



**Figure 2** : Variation des lipoprotéines en fonction du temps. Test de Friedman. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### III. d Devenir des patients

Le Tableau 1 stratifie les caractéristiques générales des patients en fonction de la mortalité à J28. Les patients décédés à J28 étaient plus âgés (67 (62-77) ans vs 63 (51-72) ans,  $p=0,0208$ ), avaient un score KDIGO maximal plus élevé (3 (2-3) vs 1 (0-2),  $p<0,0001$ ), des scores IGSII et SOFA à l'admission plus élevés (respectivement 75 (64-89) vs 54 (38-63),  $p<0,0001$  et 10 (7-12) vs 6 (4-8),  $p<0,0001$ ), des lactates plasmatiques plus élevés à l'admission (3.0 (2,0-5,3) vs 2,1 (1,3-3,3),  $p=0,0002$ ), des doses en noradrénaline à l'admission plus importantes (0,66 (0,48-1,24) micg/kg/min vs 0,18 (0,0-0,41),  $p<0,0001$ ) ainsi qu'un recours à l'épuration extra-rénal à l'admission plus important (26% vs 8%,  $p=0,0044$ ). La durée de ventilation mécanique était également plus importante dans le groupe de patients décédés à 28 jours (5 (2-12) vs 2(0-7) jours,  $p=0,0007$ ). De la même façon, les patients décédés avaient moins de jours vivants sans ventilation mécanique entre l'admission et J28 que les patients survivants à J28 (0 (0-2) jours vs 26 (11-28) jours,  $p<0,0001$ ).

En analyse multivariée, les seuls facteurs associés à la mortalité à J28 étaient un score SOFA à l'admission supérieur à 6 et une concentration basse de cholestérol total (cf Tableau 5).

Facteurs (n, %)	Analyse univariée		Analyse multivariée	
	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
<b>Catégories d'âge</b>				
- < 52 ans (n=54, 26,3%)	1			
- 52 ≤ âge < 63 ans (n=49, 29,3%)	1,8 (0,55-6)	0,3		
- 63 ≤ âge < 73 ans (n=54, 26,3%)	2,2 (0,7-7,7)	0,1		
- ≥ 73 ans (n=48, 23,4%)	3,1(1,01-9,6)	0,04		
<b>Catégories de SOFA à J1</b>				
- < 4 (n=60, 29,3%)	1			
- 4 ≤ SOFA < 6 (n=41, 20%)	0,9 (0,15-6,2)	0,9	1,03 (0,16-6,1)	0,9
- 6 ≤ SOFA < 9 (n=55, 26,8%)	5,1 (1,3-19)	0,01	4,7 (1,23-18,4)	0,024
- ≥ 9 (n=49, 23.9%)	10,6 (2,9-39)	<0,001	11,16 (2,9-42)	<0,001
<b>Catégories de lactatémies à J1 (mmol/l)</b>				
- < 1,4 (n=51, 26,3%)	1			
- 1,4 ≤ lact < 2,2 (n=47, 24,2%)	1,76 (0,4-6,7)	0,4		
- 2,2 ≤ lact < 3,4 (n=49, 25,3%)	2,9 (0,8-10,1)	0,08		
- ≥ 3,4 (n=47, 24,2%)	5,5 (1,6-18,3)	0,005		
Ventilation mécanique J1 (n=115, 56,1%)	3,7 (1,5-8,9)	0,004		
Épuration extra rénale J1 (n=22, 10,7%)	4,07 (1,6-10,5)	0,004		
Statines (n=63, 30,8%)	0,59 (0,25-1,3)	0,22		
- Cholestérol total à J1	0,54 (0,32-0,9)	0,002	0,47 (0,26-0,84)	0,012
- HDL à J1	0,42 (0,1-1,5)	0,18		
- LDL à J1	0,49 (0,2-0,9)	0,04		
- Triglycérides à J1	0,93 (0,7-1,2)	0,60		

**Tableau 5** : Facteurs associés à la mortalité à J28.

### III. e Lien entre la concentration des lipoprotéines et le devenir des patients

Concernant les variables de sévérité, nous avons trouvé une corrélation négative entre la concentration de HDL-C à J1 et le SOFA à J1 et à J3 (respectivement  $r = -0,203$ ,  $p = 0,003$  et  $r = -0,171$ ,  $p = 0,016$ ). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la concentration de HDL à J1 et la durée de séjour en réanimation. Concernant les variables intéressant le pronostic des patients, il n'a pas été retrouvé d'association entre la mortalité à J28 et la concentration de HDL-C à J1. Cependant, la concentration de HDL à J1 était statistiquement plus basse dans le sous-groupe de patients décédés ou ayant un SOFA supérieur à 6 à J3 de l'admission en réanimation (0,33 (0,26-0,65) mmol/l vs 0,50 (0,30-0,70),  $p = 0,029$ ). Par ailleurs, il y avait une corrélation positive entre la concentration de HDL-C à J1 et le nombre de jours vivants sans ventilation mécanique entre l'admission et J28 ( $r = 0,172$ ,  $p = 0,029$ ).

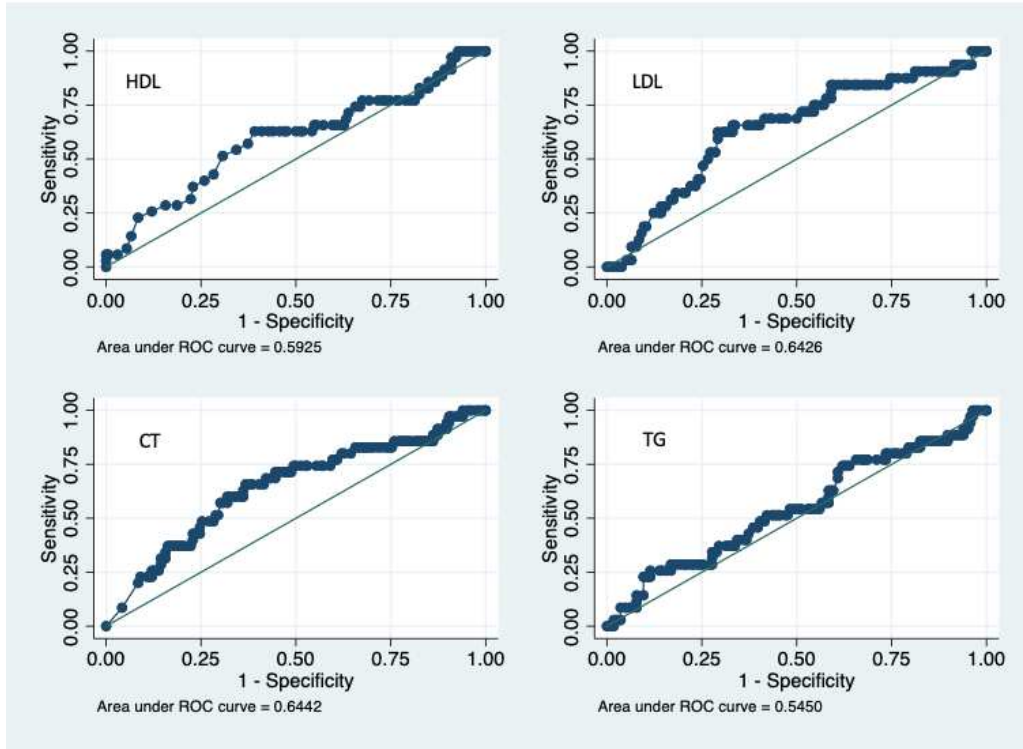
L'ensemble des données concernant toutes les lipoprotéines et leur association avec les variables de sévérité et de pronostic sont présentés dans le Tableau 6.

	CT (mmol/l) J1	p	HDL (mmol/l) J1	p	TG (mmol/l) J1	p	LDL (mmol/l) J1	p
<b>Variables de gravité</b>								
SOFA à J1	-0,082	0,24	-0,203	0,003	0,252	0,0003	-0,228	0,002
SOFA à J3	-0,173	0,015	-0,171	0,016	0,142	0,045	-0,257	0,0004
Ventilation mécanique								
non (n=64)	2,35 (1,9-2,78)	0,14	0,53 (0,31-0,69)	0,30	1,54 (1,07-2,20)	0,75	1,06 (0,84-1,49)	0,053
oui (n=141)	2,15 (1,6-2,76)		0,39 (0,27-0,70)		1,52 (1,01-2,12)		0,92 (0,52-1,50)	
<b>Espèces bactériennes</b>								
Bactéries Gram négatif								
non (n=71)	2,23 (1,72-2,77)	0,93	0,50 (0,30-0,75)	0,22	1,42 (0,98-1,96)	0,16	1,06 (0,66-1,61)	0,30
oui (n=134)	2,31 (1,7-2,78)		0,41 (0,27-0,67)		1,66 (1,072-2,26)		0,94 (0,56-1,48)	
Bactéries Gram positif								
non (n=87)	2,25 (1,77-3,01)	0,32	0,35 (0,27-0,69)	0,31	1,92 (1,29-2,36)	0,0016	0,98 (0,56-1,60)	0,99
oui (n=118)	2,24 (1,67-2,72)		0,49 (0,29-0,71)		1,39 (1,00-1,94)		1,04 (0,59-1,48)	
<b>Sepsis monomicrobien</b>								
non (n=100)	2,32 (1,62-2,71)	0,36	0,48 (0,31-0,71)	0,47	1,42 (1,0-2,06)	0,09	0,98 (0,52-1,49)	0,19
oui (n=105)	2,24 (1,84-2,92)		0,38 (0,27-0,69)		1,72 (1,07-2,29)		1,04 (0,68-1,59)	
<b>Variables pronostiques</b>								
Mortalité à J28								
non (n=170)	2,40 (1,84-2,84)	0,006	0,46 (0,29-0,70)	0,1052	1,53 (1,03-2,21)	0,43	1,05 (0,64-1,55)	0,0096
oui (n=35)	1,86 (1,47-2,41)		0,31 (0,25-0,62)		1,41 (0,89-1,98)		0,66 (0,45-1,17)	
Durée de séjour en réa	-0,051	0,47	-0,048	0,498	0,035	0,62	-0,070	0,34
Jours vivants sans VM à J28	0,159	0,023	0,172	0,014	-0,045	0,52	0,211	0,003
SOFA>6 ou décès à J3								
non (n=138)	2,39 (1,85-2,94)	0,0026	0,5 (0,30-0,70)	0,029	1,52 (1,07-2,12)	0,99	1,08 (0,73-1,63)	0,0025
oui (n=67)	2,03 (1,49-2,59)		0,33 (0,26-0,65)		1,60 (0,94-2,36)		0,71 (0,47-1,26)	

**Tableau 6** : Association entre les concentrations de lipoprotéines à J1 et les variables relatives à la sévérité et au pronostic des patients. Les variables continues ont été comparées avec un test de Mann Withney et les catégorielles un test exact de Fisher. Les coefficients de corrélation de Spearman sont exprimés dans le tableau.

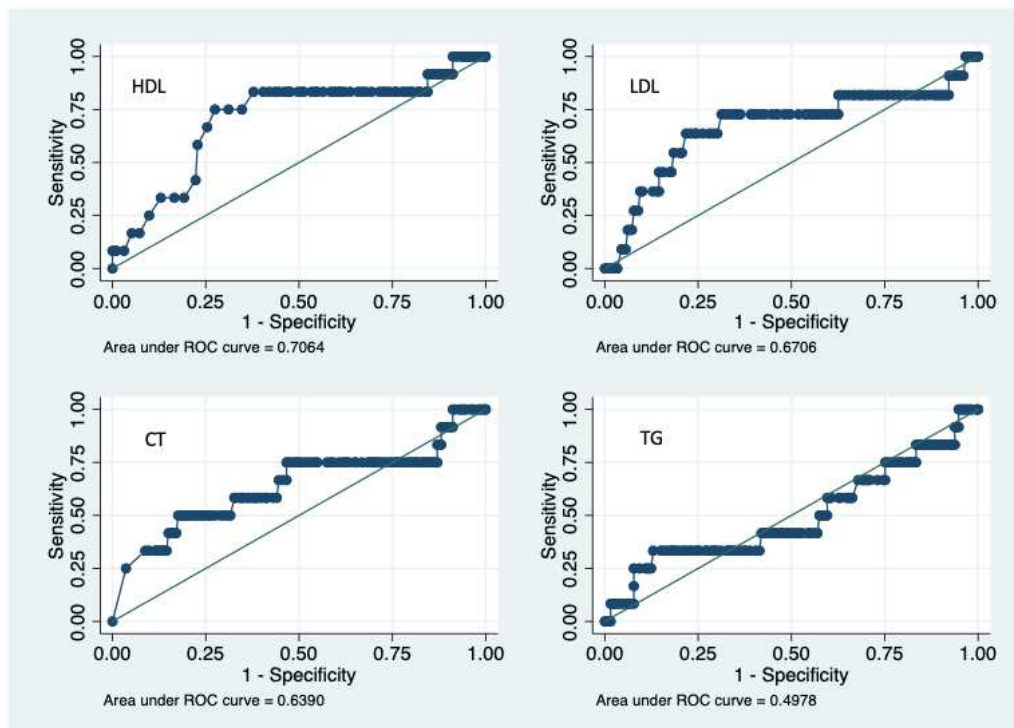
### III. f Performance des lipoprotéines pour prédire la mortalité

- La figure 3 représente les courbes ROC des lipoprotéines pour prédire la mortalité à J28.



**Figure 3** : Courbes de ROC des concentrations des lipoprotéines, du cholestérol total et des triglycérides pour la prédiction de la mortalité à J28.

- La figure 4 représente les courbes ROC des lipoprotéines pour prédire à J3 soit un score SOFA supérieur à 6 soit le décès.



**Figure 4** : Courbes de ROC pour la prédiction de la combinaison SOFA J3 >6 ou décès à J3.

Avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 72,5%, une concentration de HDL de 0,3mmol/l à l'admission semble être la valeur la plus discriminante pour prédire un score SOFA supérieur à 6 ou le décès à J3 (Aire sous la courbe 0,71). La performance de la concentration d'HDL-C à l'admission pour prédire le décès à J28 est insuffisante (Aire sous la courbe = 0,59, valeur de HDL à 0,34mmol/l, sensibilité 62,8% et spécificité à 60,8%).

### III. g Analyse selon le type de sepsis

- Dans le sous-groupe de sepsis intra-abdominal, la concentration de cholestérol total était statistiquement plus basse chez les patients décédés à 28 jours comparativement aux survivants (1,73 (1,3-2,11) mmol/l vs 2,38 (1,71-2,71) mmol/l,  $p=0,031$ ). Aucune autre différence n'a été trouvée pour les concentrations de HDL-C, LDL-C et triglycérides.

- Dans le sous-groupe de sepsis pleuro-pulmonaire, la concentration de HDL-C était statistiquement moindre chez les décédés par rapport aux survivants à J28 (0,28 (0,24-0,33) mmol/l vs 0,59 (0,33-0,67) mmol/l,  $p=0,027$ ).

- Dans le sous-groupe de patients ayant un sepsis à point de départ urinaire, la concentration de triglycérides était statistiquement plus basse chez les patients décédés par rapport aux survivants (0,8 (0,69-1,34) mmol/l vs 2,19 (1,88-2,46) mmol/l,  $p=0,025$ ).

- Dans le sous-groupe de patients ayant un sepsis de la peau et des tissus mous, la concentration de LDL-C était statistiquement plus basse chez les patients décédés par rapport aux survivants à j28 (0,63 (0,54-0,81) mmol/l vs 1,02 (0,72-1,51) mmol/l,  $p=0,034$ ).

- Aucune différence n'a été retrouvée entre les patients décédés et les survivants dans le sous-groupe correspondant aux autres sepsis.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 7.

	CT (mmol/l)	p	HDL (mmol/l)	p	TG (mmol/l)	p	LDL (mmol/l)	p
<b>Sepsis intra-abdominal</b>								
décédé (n=16)	1,73 (1,30-2,11)	0,031	0,33 (0,28-0,82)	0,54	1,31 (0,85-1,89)	0,73	0,55 (0,42-1,08)	0,13
vivant (n=71)	2,38 (1,71-2,71)		0,53 (0,32-0,74)		1,39 (0,94-1,87)		0,98 (0,54-1,50)	
<b>Sepsis pleuro-pulmonaire</b>								
décédé (n=6)	2,07 (1,90-2,40)	0,70	0,28 (0,24-0,33)	0,027	2,31 (1,01-3,95)	0,98	0,77 (0,52-1,08)	0,26
vivant (n=23)	2,45 (1,75-2,99)		0,59 (0,33-0,67)		1,92 (1,32-2,51)		1,22 (0,76-1,64)	
<b>Sepsis à point de départ urinaire</b>								
décédé (n=3)	1,53 (1,42-2,23)	0,094	0,59 (0,42-0,82)	0,65	0,80 (0,69-0,96)	0,025	1,22 (0,97-1,46)	0,74
vivant (n=32)	2,69 (2,11-3,29)		0,39 (0,29-0,65)		2,19 (1,88-2,46)		1,34 (0,90-1,78)	
<b>Sepsis de la peau et des tissus mous</b>								
décédé (n=8)	1,80 (1,49-2,58)	0,47	0,27(0,22-0,38)	0,07	1,87 (1,49-2,93)	0,16	0,63 (0,54-0,81)	0,034
vivant (n=27)	2,24 (1,57-2,72)		0,39 (0,27-0,69)		1,31 (1,12-2,09)		1,02 (0,72-1,51)	
<b>Autres sepsis</b>								
décédé (n=2)	1,87 (1,71-2,04)	0,99	0,68 (0,49-0,87)	0,40	1,05 (0,89-1,22)	0,48	0,99 (0,85-1,13)	0,81
vivant (n=33)	2,0 (1,52-2,22)		0,34 (0,27-0,70)		1,19 (0,87-1,76)		0,80 (0,58-1,14)	

**Tableau 7** : Concentration en lipoprotéines, cholestérol total et triglycérides en fonction des sous-type de sepsis (test de Mann Whitney).



### **III. h corrélation entre les concentrations antérieures de HDL et le devenir des patients**

Aucune corrélation statistique n'a été retrouvée entre les concentrations antérieures de lipoprotéines et les données de gravité ou de devenir (SOFA à J1, J3, nombre de jours vivants sans ventilation mécanique entre l'admission et J28, durée de ventilation mécanique, mortalité ou SOFA>6 ou décès à J3). Ces données sont présentées dans le tableau S2.

	CT ant (mmol/l)	p	HDL ant (mmol/l)	p	TG ant (mmol/l)	p	LDL ant (mmol/l)	p
<b>SOFA à J1</b>	-0,029	0,78	0,017	0,87	0,113	0,26	-0,025	0,81
<b>SOFA à J3</b>	0,025	0,81	-0,128	0,21	0,076	0,46	-0,035	0,73
<b>Jours vivants sans VM à J28</b>	-0,068	0,50	0,080	0,42	-0,017	0,86	-0,113	0,26
<b>Mortalité à J28</b>								
non (n=170)	5,10 (3,91-5,86)	0,32	1,25 (1,08-1,48)	0,81	1,57 (1,11-2,20)	0,40	2,45 (1,43-3,64)	0,82
oui (n=35)	4,65 (3,93-5,26)		1,22 (1,03-1,57)		1,40 (0,88-1,97)		2,70 (1,96-3,30)	
<b>Durée de séjour en réa</b>	0,036	0,72	-0,029	0,77	-0,105	0,30	0,062	0,54
<b>SOFA&gt;6 ou décès à J3</b>								
non (n=138)	4,65 (3,87-5,31)	0,79	1,16 (0,97-1,42)	0,21	1,66 (0,94-2,31)	0,33	2,70 (1,86-3,33)	0,85
oui (n=67)	4,64 (3,93-5,27)		1,30 (1,05-1,60)		1,37 (0,90-1,96)		2,67 (1,97-3,31)	

**Tableau S2** : Association entre les concentrations antérieures à l'hospitalisation de lipoprotéines, CT et TG et les variables relatives à la sévérité et au pronostic des patients. Les variables continues ont été comparées avec un test de Mann Withney et les catégorielles par un test exact de Fisher. Les coefficients de corrélation de Spearman sont exprimés dans le tableau.

#### IV. Discussion :

L'analyse de cette cohorte de 205 patients hospitalisés dans notre service pour choc septique ou sepsis sévère a donc retrouvé :

- une diminution statistiquement significative de la concentration de HDL-C entre le taux basal avant l'hospitalisation et les premiers jours du sepsis avec une remontée à la sortie du patient sans recouvrer au niveau basal.
- une absence de lien statistique entre la concentration de HDL-C et la mortalité hormis dans le sous-groupe de patient ayant un sepsis pleuro-pulmonaire où la concentration de HDL-C à l'admission était associée à la mortalité à J28.
- une association statistique entre cette concentration de HDL-C et la morbidité (score SOFA à J1, J3, le nombre de jour vivant sans ventilation mécanique entre l'admission et J28 ou encore avec la combinaison d'un score SOFA supérieur à 6 ou du décès à J3).
- qu'un seuil de HDL-C inférieur à 0,3mmol/l pouvait raisonnablement prédire une évolution péjorative à J3 (score SOFA supérieur à 6 ou décès).
- l'absence de lien retrouvé entre le bilan lipidique basal avant l'hospitalisation et le devenir des patients.

La concentration basse de HDL-C à l'admission en réanimation retrouvée dans notre cohorte est en accord avec les différentes études réalisées chez des patients septiques (251–254,257,258,327). La remontée du niveau de HDL-C au cours du temps et la guérison du processus infectieux que nous avons observé a également été décrite (251,252,254,258). Cette augmentation de la concentration de HDL-C en parallèle à l'amélioration de l'état clinique du patient peut notamment s'expliquer par la restauration d'une normovolémie, la

diminution drastique de la fuite capillaire parallèlement à une amélioration du réseau microcirculatoire, mais aussi par l'augmentation de la synthèse hépatique de HDL et par une régulation appropriée de l'expression de SRB1. A notre connaissance, notre travail est le premier répertoriant le taux basal de HDL-C avant l'épisode septique. Il est intéressant de constater que lors de la sortie du patient de la réanimation en rapport avec la guérison clinique, la concentration antérieure de HDL-C n'est pas restaurée. De plus, nous n'avons retrouvé aucun lien entre cette concentration basale et le devenir des patients, ce qui signifie probablement que le niveau basal brut sans tenir compte des éventuelles dysfonctions des particules de HDL ne suffit pas à prédire le devenir des patients.

Malgré une association encourageante entre concentration de HDL-C à l'admission et la morbidité du patient, nous n'avons trouvé aucun lien statistique entre HDL-C et mortalité dans notre cohorte de 205 patients, contrairement à plusieurs études montrant des résultats opposés (252–254,327). Nous avons plusieurs hypothèses pour expliquer cette différence :

- Malgré des niveaux importants de gravité de nos patients (IGS2 médian à 57 (40-68)), la mortalité en réanimation et à 28 jours dans notre cohorte demeure très faible (17%) comparativement aux autres études (entre 30 et 40% et jusqu'à plus de 60% de mortalité dans certaines études) (252,254,257,258). Il faut noter que certaines études datent du début du 21<sup>ème</sup> siècle et que l'amélioration des pratiques cliniques depuis une vingtaine d'année peut expliquer ces différences de devenir. Dans ce contexte de mortalité allant du simple au triple chez des patients ayant des scores de gravité comparables, il semble alors difficile de comparer nos résultats avec ceux de ces équipes.

- Nous avons dans notre service une part importante de sepsis à point de départ digestif avec ainsi davantage de sepsis avec des bactéries à gram négatif dans notre cohorte. Notre épidémiologie diffère des autres études où il y a une majorité de pneumonies et donc de sepsis à cocci gram positif. Néanmoins, en comparant le devenir de nos patients en fonction du type de germes, nous n'avons pas trouvé de différence en terme de survie.
- Contrairement à certaines études où le critère d'inclusion était la suspicion de sepsis avec un pourcentage de sepsis non documenté pouvant atteindre 50% à 60%, 90% de nos sepsis était documentés ce qui permet ainsi d'avoir une population homogène de patients.
- Le manque de puissance pourrait aussi expliquer les différences en terme de mortalité et nous inciter à augmenter le nombre de patients. Cependant, avec 205 patients inclus, notre effectif est certainement l'un des plus grand en comparaison avec les autres études (entre 50 et 150 patients en moyenne).

Certains auteurs ont proposé que la concentration de HDL-C à l'admission pouvait être un biomarqueur intéressant susceptible de prédire la mortalité avec des sensibilité et spécificité plus ou moins acceptables selon les études (252,254,262,327). Dans notre travail, avec une sensibilité de 62,8% et une spécificité de 60,8%, le seuil de 0,34 mmol/l en deçà duquel il y aurait une surmortalité ne nous semble pas assez performant. Cependant, nous avons aussi montré qu'une concentration de HDL-C inférieure à 0,3mmol/l était prédictive d'un mauvais pronostic à J3 (SOFA supérieur à 6 ou décès). Avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 72,5%, ce seuil semble davantage acceptable. De plus, la variable choisie (SOFA supérieur à 6 ou décès) se révèle être plutôt pertinente en pratique clinique.

Fort de ces résultats, et en particulier cette absence d'association retrouvée entre concentration de HDL-C et le décès des patients, notre hypothèse principale est que la diminution de la concentration de HDL-C ne suffit pas pour prédire l'évolution du patient. Des paramètres de fonctionnalité des HDL en conditions septiques tels que des modifications de taille ou de composition pourraient potentiellement nous aider à mieux caractériser nos patients. Le terme « HDL dysfonctionnelles » bien documenté dans certaines pathologies comme l'athérosclérose ou certaines maladies auto-immunes est ainsi apparu comme un nouveau concept de plus en plus étudié au cours du sepsis avec potentiellement une implication sur le devenir des patients (272,274,281,329).

Notre étude présente plusieurs limites :

- Il s'agit d'une étude monocentrique réalisée dans une réanimation chirurgicale avec une majorité de sepsis à point de départ digestif qui n'est pas le reflet du recrutement conventionnel des réanimations polyvalentes (= 70% des réanimations françaises).
- Deuxièmement, nous n'avons pas mesuré dans notre étude de biomarqueurs de l'inflammation tels que certaines cytokines, ce qui ne permet pas de comparer les patients en fonction de leur état inflammatoire.
- Concernant la cinétique, nous n'avons pas mesuré les concentrations des lipoprotéines en aval, c'est-à-dire à distance de l'épisode septique.
- Enfin, compte-tenu de l'absence de lien statistique retrouvé entre le devenir des patients et les concentrations de HDL-C, des paramètres de dysfonction des HDL (taille, étude protéomique) auraient pu être très informatifs afin de mieux caractériser les facteurs pronostics pour ces patients.



## Partie 4. Modifications structurales des HDL au cours du sepsis. Analyse protéomique

### I. Introduction :

Les lipoprotéines sont des complexes de protéines et de lipides (330). En particulier, elles sont composées d'apolipoprotéines qui vont varier en fonction du type de lipoprotéines. Le Tableau 1 met en relief la composition des lipoprotéines. Le Tableau 2 explicite les principales fonctions des apolipoprotéines.

L'émergence récente de la transcriptomique initialement évaluée dans des pathologies chroniques pourrait permettre de nouvelles perspectives thérapeutiques et diagnostics dans certaines pathologies inflammatoires aiguës telles que le trauma ou le sepsis (331–333). Les protéines jouant un rôle déterminant au cours du sepsis, les modifications du protéome ont été évaluées au cours de cette pathologie dans des études expérimentales et cliniques révélant ainsi que l'altération de ce protéome avait des conséquences importantes sur le métabolisme mitochondrial, le stress oxydant, l'initiation de la coagulation ou encore de cascades pro- ou anti-inflammatoire (334,335). Sharma *et al.* ont par exemple montré que le protéome de patients ayant des sepsis secondaires à des pneumonies communautaires était fortement remanié avec par exemple une diminution drastique de certaines apolipoprotéines (ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III et ApoE) (276). Dans une cohorte de patients ayant une pneumonie nosocomiale, la même équipe a également retrouvé une diminution de certaines apolipoprotéines (277).

Au vu de ces résultats chez ces deux populations septiques bien spécifiques, le but initial de notre travail était de réaliser une étude protéomique focalisée sur les lipoprotéines et des protéines interagissant avec le métabolisme des lipides à la fois sur le plasma mais également sur les HDL après les avoir isolées par ultracentrifugation. Compte-tenu d'une



impossibilité prolongée d'accès à l'ultracentrifugation dans notre laboratoire pour des problèmes techniques, nous n'avons pu isoler les HDL pour réaliser l'analyse protéomique secondaire. Le travail présenté ci-après a donc consisté à comparer les concentrations d'apolipoprotéines du plasma de 3 populations distinctes : un groupe de patients en choc septique hospitalisé en réanimation, un groupe de patients ayant de nombreuses comorbidités et en particulier une obésité morbide (patients hospitalisés pour chirurgie bariatrique : Sleeve-Gastrectomie) et un groupe de volontaires sains.

	HDL	LDL	VLDL	Chylomicron	IDL	Lp(a)
<b>ApoA-I</b>	+	-	-	+	-	-
<b>ApoA-II</b>	+	-	-	+	-	-
<b>ApoA-IV</b>	+	-	-	+	-	-
<b>ApoA-V</b>	+	-	+	+	-	-
<b>ApoB100</b>	-	+	+	-	+	-
<b>ApoC-I</b>	+	-	+	+	-	-
<b>ApoC-II</b>	+	-	+	+	-	-
<b>ApoC-III</b>	+	-	+	+	-	-
<b>ApoD</b>	+	-	-	-	-	-
<b>ApoE</b>	+	-	+	+	-	-
<b>Apo(a)</b>	-	-	-	-	-	+
<b>ApoH</b>	+	-	-	-	-	-
<b>ApoJ</b>	+	-	-	-	-	-
<b>ApoL</b>	+	-	-	-	-	-
<b>ApoM</b>	+	-	-	-	-	-

**Tableau 1** : Composition des lipoprotéines. Tableau réalisé à partir des données de Morrisett *et al.* et Mahley *et al.* (336,337).

<b>Principales propriétés</b>	
<b>ApoA-I</b>	Protéine majoritaire des HDL. Activation de la LCAT
<b>ApoA-II</b>	Augmente l'activité de la lipase hépatique
<b>ApoA-IV</b>	Augmenterait la sécrétion des triglycérides
<b>ApoA-V</b>	Régulateur du métabolisme des triglycérides
<b>ApoB100</b>	Constituant majoritaire des LDL. Se lie au récepteur au LDL
<b>ApoC-I</b>	Activation de la LCAT
<b>ApoC-II</b>	Activation de la lipoprotéine lipase
<b>ApoC-III</b>	Inhibition de la lipoprotéine lipase et régulation des triglycérides
<b>ApoD</b>	Transport de petites molécules hydrophobes (acide arachidonique, hormones stéroïdes, cholestérol)
<b>ApoE</b>	Implication dans l'homéostasie des lipides et lipoprotéines. Immunomodulation
<b>Apo(a)</b>	Glycoprotéine de la Lipoprotéine (a). Liaison covalente par un pont disulfure à l'ApoB100
<b>ApoH</b>	Protéines des HDL. Fonctions peu connues
<b>ApoJ</b>	Protéines des HDL. Fonctions peu connues
<b>ApoL</b>	Protéines des HDL. Fonctions peu connues
<b>ApoM</b>	Protéines des HDL. Transport de la Sphingosine-1-phosphate

**Tableau 2** : Principales fonctions des apolipoprotéines. Tableau réalisé à partir des données de Morrisett *et al.* et Mahley *et al.* (336,337).

## **II. Méthodes :**

### **II. a Méthodologie de l'étude et sélection des patients**

Il s'agissait d'une étude prospective, observationnelle réalisée dans deux services du CHU Bichat Claude-Bernard : le service de réanimation chirurgicale et celui de chirurgie générale et digestive. Les patients ont été recrutés d'octobre 2017 à décembre 2018. Tout patient admis pour choc septique selon les critères de la "Surviving Sepsis Campaign" ont été inclus (328). Les patients cirrhotiques ou immunodéprimés ont été exclus de l'étude. Tout patient majeur devant bénéficier d'une chirurgie bariatrique de type Sleeve Gastrectomie a été inclus dans cette étude. Pour limiter les biais, les patients sélectionnés de manière prospective devaient être opérés par le même chirurgien (Dr K. ARAPIS). Le troisième groupe était constitué de volontaires sains.

L'étude a été approuvée par le comité de protection des personnes Ile de France (CPP IDF1 :RCB : A02267-46).

### **II. b Recueil des données :**

Les caractéristiques démographiques des patients, le diagnostic, les scores de gravité IGSII et SOFA et les données cliniques ont été recueillis de manière prospective.

Concernant les patients septiques, les données concernant le site de l'infection et le type de bactérie ont été également collectés. La mortalité à 28 jours et 3 mois, la durée de ventilation mécanique, la durée de séjour en réanimation et à l'hôpital, le score SOFA à l'admission et à J3 ont été recueillis.

A l'admission, des prélèvements sanguins ont été effectués pour mesurer les concentrations plasmatiques de cholestérol total, HDL-C, LDL-C et de triglycérides. Les données du ionogramme sanguin et de la numération formule sanguine d'entrée ont été

également colligées. Ces analyses ont été effectuées dans le laboratoire de l'hôpital Bichat. Les concentrations de cholestérol total, HDL-C et triglycérides ont été déterminées par une méthode enzymatique de routine (analyser Bayer ADVIA 1650) et le LDL-C a été calculé en utilisant l'équation de Friedwald. Les concentrations standard de l'hôpital Bichat étaient : LDL-C :  $N < 4,2 \text{ mmol/l}$  ; HDL-C :  $1,0 < N < 2,0 \text{ mmol/l}$  ; cholestérol total  $3,4 < N < 6,2 \text{ mmol/l}$  et triglycérides :  $0,45 < N < 1,7 \text{ mmol/l}$ . Lors de ces prélèvements sanguins, environ 5 ml de sang ont été prélevés puis centrifugés deux fois (2500G, 15 min, puis 2000G, 10min) afin de recueillir le plasma qui a été conservé à la température de  $-80^{\circ}\text{C}$  afin de réaliser les analyses protéomiques.

Concernant les patients de chirurgie bariatrique, la mortalité à 28 jours et à 3 mois, la durée de séjour à l'hôpital, le score SOFA à l'admission et à J3 ont été recueillis. Les mêmes bilans et prélèvements que pour les patients septiques ont été réalisés à l'admission en pré-opératoire de la chirurgie.

Concernant les volontaires sains, seuls l'âge et le sexe ont été recueillis. Les bilans lipidiques et les prélèvements de plasma ont été recueillis une fois.

## II. c Analyse protéomique :

### - Préparation des échantillons :

Les plasmas (40  $\mu$ l) ont été réduits [ajout de 120  $\mu$ l de bicarbonate d'ammonium (50 mmol/l) contenant 7 mg/ml de Détergent RapidGest (Waters Corporation) puis incubés pendant 10 min à 80°C avant addition de dithiothréitol (100 mmol/l, 20  $\mu$ l) et incubation pendant 20 min à 60°C]. Les protéines plasmatiques ont ensuite été alkylées [addition d'iodoacétamide (200 mmol/l, 20  $\mu$ l) puis incubées pendant 20 min à l'obscurité à température ambiante] et digérées avec la trypsine pendant la nuit [5 mg/ml dans HCl (1 mmol/l, 30  $\mu$ l) à 37°C] en utilisant les solutions du kit ProteinWorks™ eXpress (Waters Corporation®) conformément aux instructions du fabricant. Les peptides protéotypiques des protéines cibles ont été utilisés comme standards internes (IS) et un mélange d'étalons a été ajouté à la digestion jusqu'à une concentration finale de 0,5  $\mu$ mol/l.

Après digestion, les échantillons ont été purifiés avec des cartouches Oasis HLB 1 cc de 30 mg (Société des eaux). Les cartouches ont été conditionnées, équilibrées, chargées, lavées et éluées, respectivement avec du méthanol (1 ml), de l'eau (1 ml), les échantillons (190  $\mu$ l), du méthanol à 5% (1 ml) et méthanol à 80% (500  $\mu$ l). Les éluats ont été séchés sous un flux d'azote, puis le culot a été repris avec 150  $\mu$ l d'acétonitrile à 5% contenant 0,1% d'acide formique puis 20  $\mu$ l d'échantillon ont été injectés dans le LC-MS / MS système (Liquid Chromatography-Mass System).

### - Analyse LC-PRM (Liquid Chromatography- Parallel reaction monitoring)

20 microlitres d'échantillons sont chargés puis séparés sur une colonne en phase inverse Aeris™ 1,7  $\mu$ m, 100 x 2,1 mm, PEPTIDE XB-C18. Les peptides sont séparés en fonction de leur hydrophobicité par l'application d'un gradient linéaire de 1% à 29% de

tampon B (100% Acétonitrile, 0,1%Acide formique) à un débit de 0,350 ml/min sur une durée de 13,5 min. Cette étape d'élution est suivie d'une phase de lavage puis d'une phase d'équilibration.

Les peptides élués sont analysés sur le Q-Exactive Plus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) en utilisant le mode Parallel reaction monitoring (PRM) où les ions précurseurs, présents dans la liste d'inclusion, seront isolés par le quadropôle du spectromètre de masse avec une fenêtre de sélection de  $\pm 1,4$  m/z, avec un temps d'injection maximal de 120 ms ou 250 ms. L'analyse des ions fragments est effectuée dans l'Orbitrap à une résolution de 35 000 (à 200 m/z). L'optimisation de l'analyse ciblée des peptides d'intérêts se fait aussi par l'utilisation de différentes énergies de fragmentation (CE = 17, 20, 22, 23, 25, 28, 30 eV) présent dans la liste d'inclusion.

- Analyse et traitement des données :

L'acquisition des échantillons sur le Q-Exactive a permis de fournir des données brutes de spectrométrie de masse qui sont soumis au logiciel Skyline version 19.1 afin d'effectuer une quantification des peptides d'intérêt présent dans les différents échantillons.

## II. d Analyse statistique :

Les variables catégorielles ont été comparées à l'aide du test du Khi-deux ou du test exact de Fisher. Les variables continues ont été comparées à l'aide du test t de Student (pour les données paramétriques) ou du test de Mann Whitney (pour les données non paramétriques), selon les cas. Les variables continues ont été comparées entre elles à l'aide du coefficient de Spearman. Un p inférieur à 0,05 était considéré comme statistiquement significatif. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de Graphpad Prism 4.0 (Graphpad® Software, La Jolla, CA, USA).

### III. Résultats :

#### III. a population :

Au total, 16 patients en choc septique et 15 patients hospitalisés pour Sleeve gastrectomie ont été inclus dans notre étude.

Les patients septiques étaient plus âgés que les patients de chirurgie bariatrique (62 (42-75) ans vs 41 (31-52) ans,  $p=0,01$ ) et les BMI étaient plus faibles que ceux des patients de chirurgie bariatrique (33 (26-37) vs 43 (39-46),  $p=0,0002$ ).

Dans le groupe de patients septiques, 50% des patients avaient un sepsis à point de départ digestif, 25% un sepsis de la peau et des tissus mous, 12,5% un sepsis pleuro-pulmonaire, 6,25% un sepsis à point de départ urinaire et 6,25% un sepsis ostéo-articulaire.

Concernant les critères de gravité, les patients ayant un choc septique avaient un score SOFA et un IGSII à l'admission, un score SOFA à J3 et une durée de ventilation mécanique statistiquement plus élevés que les patients de chirurgie bariatrique. Il n'y avait pas de différence de mortalité à 28 jours et à 3 mois entre ces deux groupes.

Les caractéristiques générales de ces patients sont explicitées dans le Tableau 3.

15 patients volontaires sains ont été inclus. L'âge médian était de 53 (42-58) ans. L'effectif comportait 6 hommes (40%) et 9 femmes (60%).



	Choc septique (n=16)	Sleeve-gastrectomie (n=15)	p
Age (années)	62 (42-75)	41 (31-52)	0,01
Sexe masculin n, (%)	5 (31%)	3 (20%)	0,69
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	33 (26-37)	43 (39-46)	0,0002
<i>Comorbidités</i>			
HTA n, (%)	6 (38%)	1 (7%)	0,08
Diabète n, (%)	3 (19%)	2 (14%)	1,0
Dyslipidémie n, (%)	2 (12,5%)	1 (7%)	1,0
Coronaropathie n, (%)	3 (19%)	0 (0%)	0,23
<i>Type de sepsis</i>			
- digestif n, (%)	8 (50%)	-	
- peau et tissu mou n, (%)	4 (25%)	-	
- pleuro-pulmonaire n, (%)	2 (12,5%)	-	
- voies urinaires n, (%)	1 (6,25%)	-	
- ostéo-articulaire n, (%)	1 (6,25%)	-	
IGSII	61 (56-78)	7 (0-7)	<0,001
SOFA J1	8 (6-10)	0 (0-0)	<0,0001
SOFA J3	6 (4-7)	0 (0-0)	<0,0001
Durée de séjour en réa (jours)	10 (5-24)	3 (3-3)	<0,0001
Durée de ventilation mécanique (jours)	4 (2-13)	0 (0-0)	<0,0001
Décès à J28 n, (%)	4 (25%)	0 (0%)	0,1
Décès à 3 mois n, (%)	4 (25%)	0 (0%)	0,1

**Tableau 3** : Caractéristiques générales de la population. Les données sont exprimées en médiane (IQ25-IQ75). Les comparaisons entre les deux groupes ont été réalisées par un test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives et un test exact de Fisher pour les variables catégorielles.

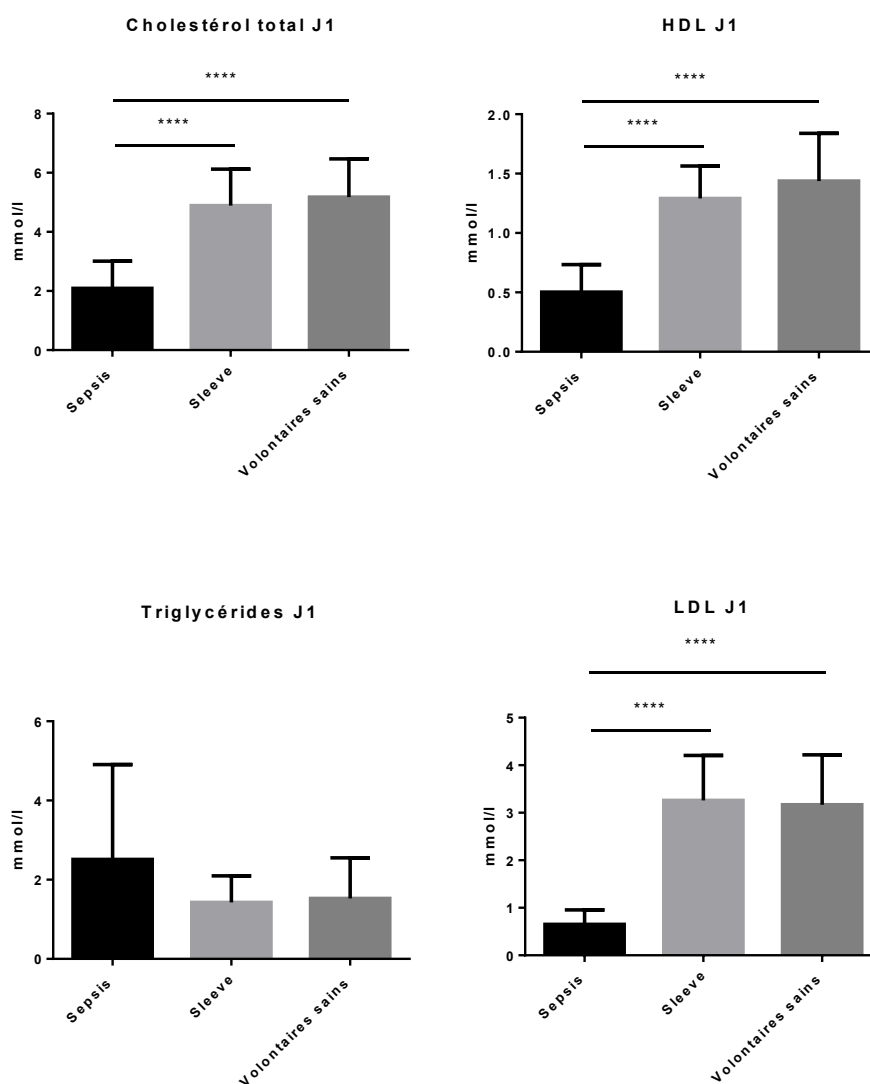
### III. b bilans lipidiques :

A l'admission, à l'exception des TG, les concentrations de CT, HDL-C et LDL-C des patients septiques étaient statistiquement plus basse que celles des patients de chirurgie bariatrique et également que celles des volontaires sains. Il n'y avait pas de différence significative entre les patients de chirurgie bariatrique et les volontaires sains concernant l'ensemble du profil lipidique.

Le Tableau 4 et la Figure 1 mettent en évidence les profils lipidiques à l'admission.

	Choc septique (n=16)	Sleeve- gastrectomie (n=15)	Volontaires sains (n=15)	p
Profil lipidique à J1 (mmol/l)				
CT	1,82 (1,43-2,41)	4,92 (4,08-5,81)	5,02 (4,78-6,06)	<0,0001
HDL	0,45 (0,3-0,73)	1,2 (1,1-1,54)	1,46 (1,11-1,66)	<0,0001
TG	1,6 (1,28-2,04)	1,57 (0,86-1,76)	1,10 (0,72-1,77)	0,23
LDL	0,64 (0,43-0,83)	3,11 (2,74-3,87)	3,14 (2,47-3,73)	<0,0001

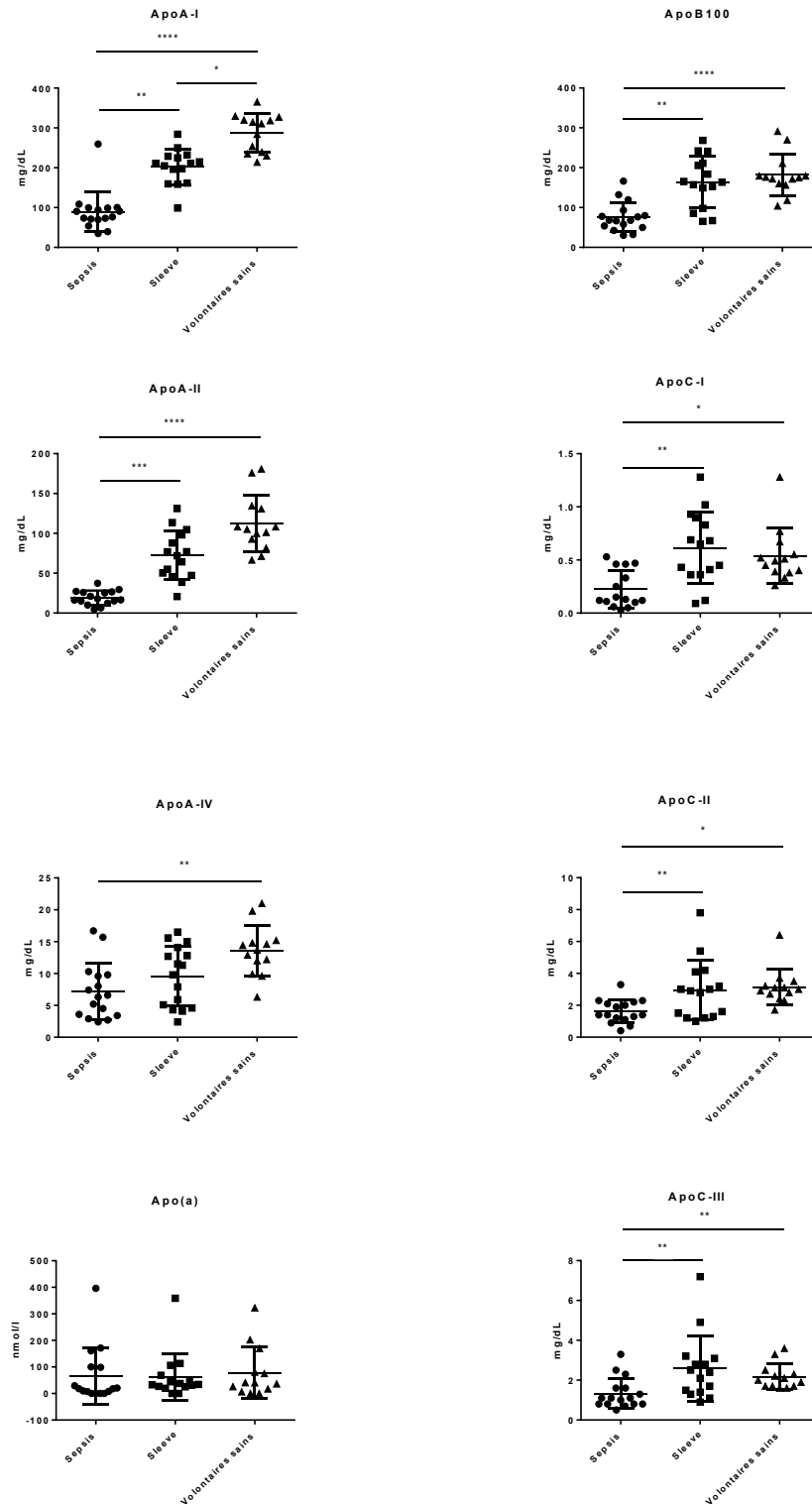
**Tableau 4** : Profils lipidiques à J1 des patients septiques, de chirurgie bariatrique et des volontaires sains (test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn pour la comparaison entre chaque groupe).



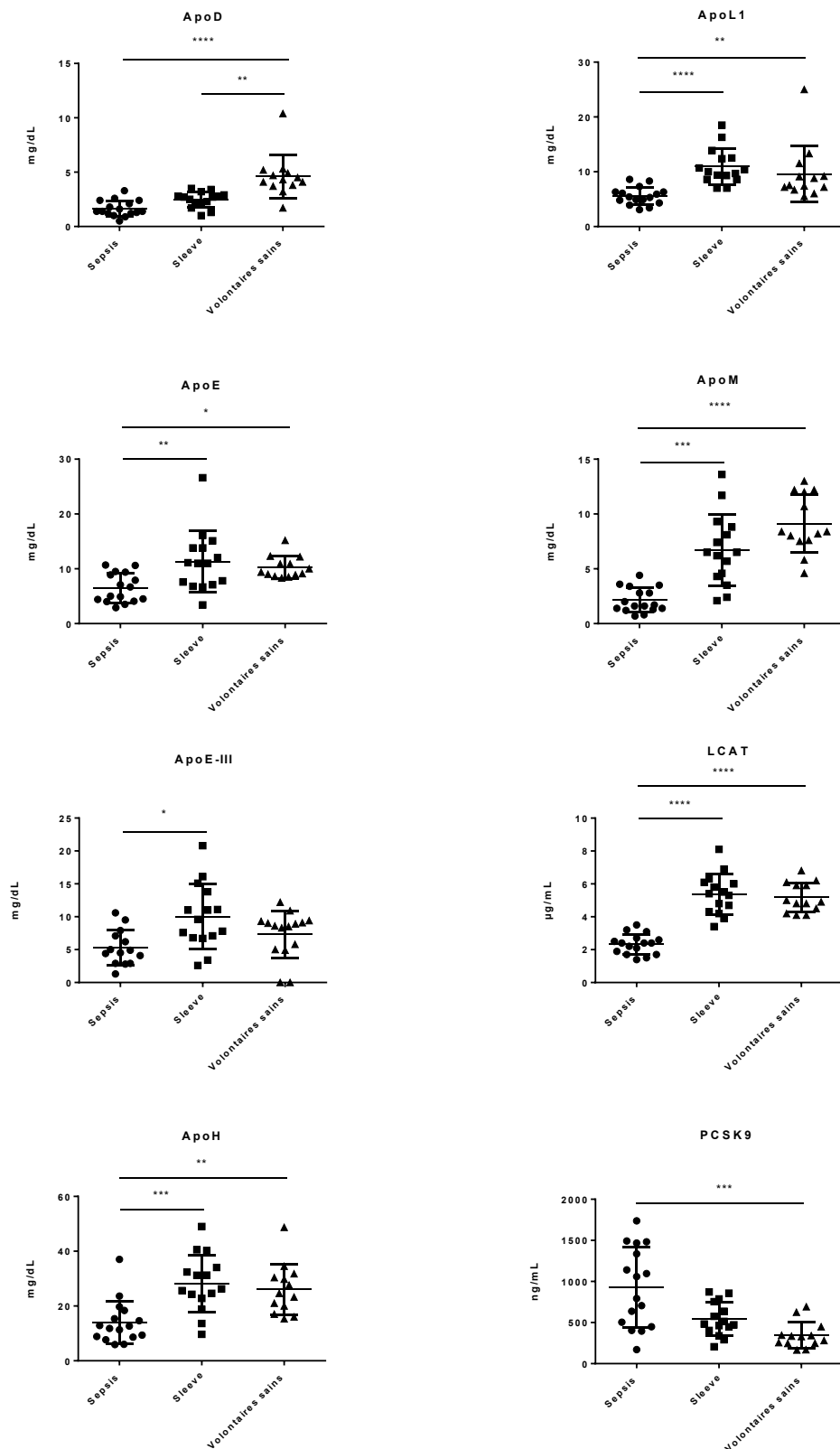
**Figure 1** : Concentrations de CT, HDL-C, triglycérides et LDL-C à l'admission. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn pour la comparaison entre les groupes. \* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01 ; \*\*\* : p<0,001 ; \*\*\*\* : p<0,0001.

### III. c : Analyse protéomique

- Au total, 16 protéines d'intérêt ont été évaluées : Apo(a), ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE, ApoE-III, ApoL, ApoL1, ApoM, LCAT, PCSK9 (cf Figures 2 et 3).
- A l'instar de ce que nous avons observé pour HDL-C et LDL-C (cf tableau 4 et figure 1), les concentrations d'ApoA-I, ApoA-II, ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE, ApoH, ApoL1, ApoM, et LCAT étaient statistiquement plus basses chez les patients septiques comparativement à la fois aux patients de chirurgie bariatrique et aux volontaires sains.
- Dans la grande majorité des cas (ApoA-II, ApoA-IV, ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE, ApoH, ApoL1, ApoM, LCAT), il n'y avait aucune différence de concentration entre les patients bariatriques et les volontaires sains.
- Aucune différence n'a été mise en évidence entre les 3 groupes concernant l'Apo(a).
- Enfin, la concentration de PCSK9 était statistiquement plus élevée que celle des volontaires sains (pas de significativité entre sepsis et chirurgie bariatrique).



**Figure 2:** Comparaison des concentrations d'ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, Apo(a), ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III à J1 en fonction des groupes : sepsis, sleeve et volontaires sains (test de Kruskal-Wallis puis test de Dunn).



**Figure 3:** Comparaison des concentrations d'ApoD, ApoE, ApoE-III, ApoH, ApoL1, ApoM, LCAT, PCSK9 à J1 en fonction des groupes : sepsis, sleeve et volontaires sains (test de Kruskal-Wallis puis test de Dunn).

### III. d Corrélations entre les apolipoprotéines et HDL-C / LDL-C (tableau 5)

Selon les groupes de patients, nous avons trouvé de grandes différences de corrélation entre les apolipoprotéines et les concentrations de HDL-C/ou LDL-C :

- Dans le groupe sepsis, l'ApoA-I et l'ApoA-II étaient corrélées au HDL-C (respectivement  $r=0,72$   $p=0,002$  et  $r= 0,78$   $p=0,0006$ ) mais il n'y avait aucune corrélation entre le LDL-C et ApoB100 ( $r=0,35$ ,  $p=0,18$ ). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les HDL et les apolipoprotéines habituellement en lien avec les HDL (ApoC, D, E,H,L,M).

- Dans le groupe de volontaires sains, la concentration d'ApoA-I était corrélée aux taux de HDL-cholestérol ( $r=0,76$ ,  $p=0,0034$ ) et il y avait une corrélation positive entre celle d'ApoB100 et les taux de LDL-cholestérol ( $r=0,65$ ,  $p=0,019$ ). Dans ce groupe, il y avait une corrélation positive entre ApoC, ApoC-I, ApoC-II et le LDL-C, et nous n'avons pas trouvé de corrélation entre ces apolipoprotéines avec le HDL-C.

- Dans le groupe chirurgie bariatrique, à l'instar des résultats concernant le groupe de volontaires sains, les concentrations d'ApoA-I étaient corrélées de manière significative aux taux d'HDL-C ( $r=0,55$ ,  $p=0,04$ ) et celles d'ApoB100 au LDL-C ( $r=0,92$ ,  $p<0,0001$ ).

L'ApoD isolément avait une forte corrélation avec le HDL-C ( $r=0,83$   $p=0,0004$ ).

- Dans les trois groupes de patients, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les lipoprotéines et l'Apo(a).

- De manière intéressante, dans le groupe chirurgie bariatrique, la LCAT et PCSK9 étaient corrélées positivement avec le LDL-C (respectivement  $r=0,82$   $p=0,0007$  et  $r=0,60$   $p=0,027$ ). Ces corrélations n'ont pas été retrouvées dans les groupes sepsis et de volontaires sains.

### III. e Corrélation avec les marqueurs de gravité dans le sous-groupe de patients septiques

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les marqueurs de devenir et de gravité (SOFA J1, SOFA J3, IGSII, durée de séjour en réanimation et durée de ventilation mécanique) et les concentrations de HDL-C, d'apolipoprotéines, de LCAT et de PCSK9 (données non montrées dans le manuscrit).

	SEPSIS (n=16)				SLEEVE (n=15)				VOLONTAIRES SAINS (n=15)			
	HDL, r	p	LDL, r	p	HDL, r	p	LDL, r	p	HDL, r	p	LDL, r	p
<b>ApoA-I</b>	0,72	0,002	0,32	0,23	0,55	0,04	0,77	0,0019	0,76	0,0034	-0,26	0,39
<b>ApoA-II</b>	0,78	0,0006	0,35	0,1	0,19	0,52	0,30	0,28	0,06	0,83	0,25	0,40
<b>ApoA-IV</b>	0,12	0,67	0,54	0,03	-0,42	0,13	-0,15	0,62	0,25	0,40	0,05	0,88
<b>Apo(a)</b>	0,04	0,89	0,42	0,10	-0,04	0,86	-0,03	0,9	0,34	0,26	0,12	0,70
<b>ApoB100</b>	-0,47	0,06	0,35	0,18	0,23	0,43	0,92	<0,0001	-0,36	0,23	0,65	0,019
<b>ApoC-I</b>	-0,05	0,86	0,33	0,23	0,17	0,55	0,83	0,0005	0,027	0,94	0,55	0,05
<b>ApoC-II</b>	-0,33	0,19	0,49	0,06	0,23	0,42	0,80	0,001	-0,12	0,69	0,67	0,014
<b>ApoC-III</b>	-0,31	0,22	0,48	0,06	0,035	0,90	0,72	0,005	-0,50	0,08	0,64	0,022
<b>ApoD</b>	0,37	0,15	-0,09	0,73	0,83	0,0004	0,14	0,63	0,06	0,85	-0,27	0,37
<b>ApoE</b>	-0,18	0,50	-0,006	0,98	0,52	0,06	0,89	<0,0001	-0,19	0,53	0,0	1
<b>ApoE-III</b>	0,03	0,92	0,40	0,15	0,09	0,77	0,69	0,007	0,11	0,70	0,20	0,46
<b>ApoH</b>	-0,19	0,46	0,36	0,17	0,27	0,35	0,71	0,005	0,17	0,58	0,04	0,9
<b>ApoL1</b>	0,09	0,71	-0,27	0,30	0,06	0,81	0,64	0,02	-0,37	0,21	-0,37	0,20
<b>ApoM</b>	0,11	0,68	0,23	0,38	0,44	0,12	0,70	0,007	0,25	0,41	0,07	0,82
<b>LCAT</b>	0,007	0,1	0,26	0,34	0,38	0,18	0,82	0,0007	0,07	0,83	0,44	0,13
<b>PCSK9</b>	-0,35	0,18	-0,17	0,52	0,15	0,6	0,60	0,027	0,15	0,63	0,54	0,06

**Tableau 5** : Corrélation entre les taux d'apolipoprotéines, le HDL-C et le LDL-C (coefficient de Spearman = r).



#### IV. Discussion :

Nous avons donc montré dans cette partie que :

- la grande majorité des apolipoprotéines quantifiées par spectrométrie de masse avait des niveaux diminués dans le groupe septique par rapport aux deux autres groupes avec une corrélation positive avec les concentrations de HDL-C.
- Aucune différence de concentration n'a été constaté entre les différents groupes concernant l'Apo(a).
- La concentration de PCSK9 avait une augmentation significative chez les patients septiques comparativement aux autres patients.
- Concernant les corrélations entre les apolipoprotéines et les taux de HDL-C et LDL-C, nous avons trouvé une hétérogénéité majeure entre les 3 groupes.
- Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les apolipoprotéines et les marqueurs de gravité ou de devenir des patients.

L'intérêt de comparer une population septique et une population de patient obèse ayant *in fine* des facteurs de risque cardio-vasculaire était ainsi de comparer les modifications de lipoprotéines de patients exposés à de l'inflammation aiguë et des patients exposé à de l'inflammation de manière chronique. Ce qui ressort ainsi de cette comparaison, est qu'il y a une diminution drastique des apolipoprotéines dans le modèle d'inflammation aiguë alors qu'il n'y a globalement aucune différence en terme d'apolipoprotéines entre les patients « agressés » chroniquement par de l'inflammation de bas grade au niveau vasculaire et des volontaires sains qui ont des concentrations normales d'apolipoprotéines.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de l'étude de Sharma *et al.* qui trouvaient également une diminution des taux d'apolipoprotéines chez des patients septiques en comparaison avec des volontaires sains (ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III et ApoE) (277). Par rapport à cette étude, l'originalité de ce travail réside dans le fait qu'il s'agit du premier travail impliquant une analyse protéomique comparant des patients septiques avec une autre population inflammatoire.

Des études utilisant des dosages conventionnels d'apolipoprotéines et en particulier d'ApoA-I avaient déjà montré une diminution au cours du sepsis (252,254). Concernant l'ApoM, également majoritairement associée avec les HDL, la diminution importante de sa concentration observée dans notre étude, est en accord avec les travaux de Kumaraswamy *et al.* qui avaient dosé l'ApoM en contexte de sepsis et de SIRS (méthode ELISA) (338).

La majorité des apolipoprotéines mesurées dans ce travail fait partie de la composition des HDL. Or, il est intéressant de noter qu'hormis l'ApoA-I, nous n'avons trouvé que très peu de corrélations statistiquement significatives entre ces apolipoprotéines d'intérêt mesurées et les HDL et cela quel que soit le groupe de patients. Nous avons trouvé des différences notables entre les groupes et en particulier entre les patients septiques et les autres concernant les corrélations avec les HDL ce qui pourrait être le reflet d'un changement qualitatif du protéome alors même que les résultats en terme de concentration brute retrouvaient plutôt des relations assez binaires avec des diminutions drastiques des apolipoprotéines dans le groupe sepsis par rapport aux autres groupes. Par exemple, il est intéressant de constater que l'ApoD, protéine habituellement en lien avec les HDL, était

fortement corrélée avec les HDL dans le groupe de patients obèses ( $r=0,83$ ,  $p=0,0004$ ) alors qu'il n'existait aucune corrélation chez les patients septiques ( $r=0,37$ ,  $p=0,15$ ).

Une analyse protéomique après isolement des HDL serait informative car permettrait de pouvoir distinguer les apolipoprotéines spécifiquement liées avec les HDL et par la même permettre de les quantifier. Ces absences de corrélation dans notre travail pourraient spécifiquement refléter la part de ces apolipoprotéines non liées avec les HDL, indice d'une possible perte de fonction.

L'Apo(a) est une apoprotéine liée à l'ApoB100 formant ainsi la lipoprotéine (a) (Lp(a)) (339) qui est connue pour ses propriétés athérogènes (340,341). Dans notre travail, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre cette apolipoprotéine et les taux de HDL-C et LDL-C. De plus, alors même que nous avons montré une diminution significative de l'ApoB100 chez nos patients septiques, aucune différence de concentration concernant l'Apo(a) n'a été retrouvée dans notre étude. Ces résultats diffèrent des travaux de Mooser et al. mettant en évidence une diminution de la Lp(a) et de l'Apo(a) dans une cohorte de patients septiques (342).

PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin enzyme 9) a pour rôle principal d'augmenter le taux de LDL en diminuant l'expression des récepteurs aux LDL (343,344). Par ailleurs, PCSK9 semble jouer un rôle de régulateur de la réponse de l'hôte face à un stimulus pro-inflammatoire (345,346). En montrant que, à l'inverse des apolipoprotéines décrites ci-dessus, la concentration de PCSK9 était augmentée au cours du sepsis en comparaison avec celle des volontaires sains, notre étude est dans la lignée d'autres études retrouvant également une augmentation de sa concentration au cours d'épisodes inflammatoires

septique et non-septiques (347–350). Une absence de corrélation entre PCSK9 et le taux de LDL-C, hormis dans le groupe de patients obèses ( $r=0,6$  ;  $p=0,027$ ) va dans le sens d'une hétérogénéité importante du protéome en fonction des différentes conditions.

Enfin, l'absence de corrélation entre les concentrations des apolipoprotéines et en particulier l'ApoA-I avec les paramètres de devenir et de gravité des patients confirme, à l'instar de l'absence de corrélation retrouvée entre ces données et les taux de HDL-C, que la concentration brute de ces lipoprotéines n'est probablement pas suffisante pour caractériser le devenir des patients.

Notre travail a certaines limites :

- Il s'agit d'une étude monocentrique avec un faible effectif de patients. Néanmoins, avec ce petit nombre de patients, nous avons tout de même pu mettre en évidence des différences significatives entre les groupes.
- A cause d'un problème technique survenu durant la réalisation de cette thèse (ultracentrifugeuse non fonctionnelle), nous n'avons pas pu isoler les HDL pour réaliser une approche protéomique ciblée. Ce travail nous aurait permis d'avoir une vision plus spécifique des dysfonctions de ces particules de HDL.
- Enfin, il a été montré dans de précédentes études une diminution de l'ApoA-I au profil de protéines de l'inflammation telles que la SAA chez des patients ayant des pathologies cardiovasculaires (179). Malheureusement, nous n'avons pas dosé ces protéines de l'inflammation dans ce travail.



## **Partie 5. Effets de l'administration de HDL reconstituées dans des modèles murins de sepsis.**

**Cf annexe : Tanaka et al. Reconstituted High-Density Lipoprotein therapy improves survival in mouse models of sepsis. En revision dans *Anesthesiology***

### **I. Introduction**

En nous basant sur la diminution drastique des concentrations de HDL-C au cours du sepsis et des effets pléiotropes endothélio-protecteurs des HDL décrits précédemment, nous avons émis l'hypothèse qu'une supplémentation en HDL fonctionnelles dans un modèle murin de sepsis pourrait améliorer la survie. Plusieurs études animales ont testé l'injection de peptides mimétiques de l'apoA-I ou des rHDL humaines administrés avant l'injection de LPS ou lors d'un sepsis débutant. Nous avons utilisé ici des rHDL à base d'ApoA-I et de phosphatidylcholines de soja (CSL111, CSL Behring, Suisse), testées précédemment lors d'un essai clinique randomisé impliquant des patients ayant subi un infarctus du myocarde (304). Il s'agit de la première étude à tester les effets thérapeutiques potentiels des HDL dans 3 modèles différents de sepsis, en utilisant des rHDL potentiellement injectables en milieu clinique.

## **II. Matériels et méthodes**

Les HDL reconstituées (CSL111<sup>®</sup>) ont été fournis par CSL Behring AG, Berne, Suisse. Elles consistent en de l'ApoA-I purifiée à partir de plasma humain combinée à des phosphatidylcholines de soja pour former des particules discoïdales similaires aux HDL natives (351).

### **II. a Animaux**

Des souris C57BL/6 femelles et mâles âgées de 10 semaines pesant de 20 à 25 g ont été utilisées dans notre étude (rapport de sexe 1:1). Toutes les expérimentations ont été réalisées conformément à la législation sur la protection des animaux et ont été approuvées par les comités éthiques pour l'expérimentation animale de l'INSERM 1148, Paris (autorisation 2012-15/698-097) et du CYROI n°114 (autorisation 14827-2018012212274175 V3 et 20938-20190311144277 V7). Les expérimentations ont été réalisées dans l'animalerie en salle de microchirurgie.

### **II. b Modèles de sepsis**

Une anesthésie générale a été pratiquée sur les souris au gaz isoflurane à 2 % et avec 0,05 mg/kg de buprénorphine injectée comme analgésique.

La ligature et la ponction caecale (CLP) ont été effectuées tel que décrit précédemment par Rittirsch *et al.* (352,353). Après anesthésie de la souris, l'abdomen a été ouvert, puis le caecum a été extériorisé. Une ligature a été pratiquée sur la partie proximale du caecum juste après la valve iléo-caecale, puis le caecum a été perforé de part et d'autre avec une aiguille 21G afin d'induire un sepsis grave. Le caecum a été délicatement pressé pour laisser

passer une petite quantité d'excréments à travers les trous de perforation. Le cæcum a ensuite été remis en place dans la cavité péritonéale et la paroi abdominale a été fermée par une suture simple.

Juste après l'opération, nous avons administré du sérum physiologique (1,2 ml/100 g de poids corporel) et de la buprénorphine (5 ng/100 g de poids corporel).

Deux heures après la CLP, chaque animal a reçu, soit du CSL111 (40 mg apoA1/kg) soit du sérum physiologique. L'injection s'est faite par la veine caudale et a été répétée à 24h et 48h après la CLP. Des souris "sham" (n=16) ont subi la même intervention chirurgicale, mais le caecum n'a ni été ligaturé ni été perforé.

Une randomisation a été effectuée pour répartir les régimes médicamenteux entre chaque groupe, en aveugle par un observateur de notre laboratoire.

## **II. c Injection intrapéritonéale de bactéries (modèle IP)**

Ce deuxième modèle de sepsis permet de provoquer une péritonite caractérisée par un transfert intravasculaire rapide de bactéries. La souche bactérienne *Escherichia coli* IA176 a été injectée par voie IP. Pour déterminer la concentration bactérienne optimale, une courbe de corrélation entre la densité optique (OD) à 600 nm de la solution bactérienne et le nombre d'unités formant des colonies (CFU) développées sur gélose Luria-Bertani (LB) a été réalisée. Les bactéries ont été cultivées dans un milieu de culture LB à 37°C pendant 20 heures. Les bactéries ont été lavées deux fois avec une solution saline par centrifugation (3000g pendant 15 minutes). Des dilutions ont ensuite été réalisées afin d'ensemencer des milieux de culture qui ont ensuite été incubés à 37°C pendant 24 heures avant le comptage des CFU. La concentration de bactéries a été estimée par spectrophotométrie (OD 600 nm).  $4.10^7$  CFU/ml ont été injectées dans la cavité intrapéritonéale dans un volume de 400 µL de



solution saline. Pour choisir cette dose, une expérience pilote a été réalisée avec injection de différentes concentrations de bactéries, afin d'atteindre une infection grave mais non mortelle à 100% (70% de la mortalité). Brièvement, après une anesthésie chez la souris (n=10), différentes concentrations d'*E. coli* ont été injectées (de  $10^7$  à  $10^8$  CFU/ml). La concentration de  $4.10^7$  CFU/ml a été choisie parce que le taux de mortalité à 36 heures était de 80 %. En conclusion, une concentration de  $4.10^7$  CFU/ml d'*Escherichia coli* souche IAI76 a été injectée dans la cavité intrapéritonéale dans un volume de 400  $\mu$ L de solution saline.

Après l'injection de la bactérie, chaque animal a reçu en aveugle soit du CSL111 (40 mg/kg), soit une solution de sérum physiologique. Les injections ont été faites dans la veine rétro-orbitaire. Des souris "sham" ont subi une chirurgie abdominale sans aucune injection bactérienne.

## **II. d Modèle de pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* (modèle PA)**

La souche bactérienne ATCC 27853 a été cultivée en phase semi-logarithmique dans une solution BHI (Brain Heart Infusion) pendant 24 heures à 37 °C. Les bactéries ont ensuite été lavées deux fois puis diluées dans une solution de PBS à une concentration finale de  $4 \times 10^8$  UFC/ml. Notre protocole a été approuvé par notre comité d'éthique local (20938-201903111114427274). Des souris C57Bl/6 (8 à 10 semaines) ont été anesthésiées avec de l'isoflurane en inhalation à 2 % et de la buprénorphine (0,05 mg/kg par voie sous-cutanée) puis placées en position couchée. La région cervicale a été stérilisée et une incision de 1 cm de la ligne médiane a été réalisée. La trachée a été exposée par dissection puis a ensuite été canulée avec un cathéter intraveineux 22G. 50 $\mu$ l de solution de *Pseudomonas aeruginosa* ou 50 $\mu$ l de solution saline ont ensuite été instillés dans la trachée par le cathéter. La peau a été suturée puis les animaux ont été placés dans une cage chaude. L'analgésie et l'hydratation

ont été réalisées avec de la buprénorphine et une injection de sérum physiologique. Les animaux étaient maintenus à 37°C dans leurs cages puis étaient placés dans une pièce à température et lumière contrôlées avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Deux heures après l'administration du modèle PA, chaque animal a reçu soit du CSL111 (40 mg apoA1/kg) soit du sérum physiologique. L'injection s'est faite par la veine caudale.

## **II. e Courbes de survie**

Dans chacun des deux groupes de sepsis intra-abdominal (CLP et IP), des souris ont été observées toutes les deux heures pendant 150 heures.

## **II. f Analyses plasmatiques et histologiques**

Vingt-quatre heures après l'intervention chirurgicale, les animaux ont été sacrifiés, du sang, du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) et des tissus ont été prélevés pour analyse. Les quantifications des analyses histologiques ont été effectuées par un observateur en aveugle.

Prélèvement d'échantillons de plasma et d'organes : Quatre heures avant la CLP, 300µL de sang ont été prélevés sur EDTA à partir de la veine rétro-orbitaire. Le sang a été centrifugé à 2000g à 20°C pendant 10 minutes, le plasma a été centrifugé une seconde fois (2000g, 20°C, 10 minutes) puis conservé à -80°C. Des échantillons de sang total ont également été prélevés pour déterminer la concentration bactérienne.

A 24 heures, les souris ont été exsanguinées par ponction cardiaque après la réalisation d'une thoracotomie (environ 500 µl de sang sur EDTA). La même procédure de centrifugation et de stockage que celle décrite ci-dessus a été appliquée.

Après ligature du poumon droit, le poumon gauche a été gonflé avec une solution d'OCT à une pression de 25 cmH<sub>2</sub>O, placé dans une solution d'OCT avant congélation dans l'azote liquide pour la réalisation ultérieure de coupes au cryotome (6µm). La partie restante du poumon a été divisée en 2 : une partie a été pesée puis incubée avec du RPMI pendant 24 heures à 37°C, puis stockée à -20°C. L'autre partie a été conservée à -20°C dans une solution Trizol pour l'extraction de l'ARN. Pour les études histologiques, des échantillons de foie, de poumon droit, de rate et de rein ont également été conservés à -20°C.

Dans le modèle PA, à 24 heures, des souris ont été exsanguinées par ponction cardiaque après une thoracotomie (environ 500 µl de sang EDTA ont été recueillis). Un lavage broncho-alvéolaire (LBA) a été effectué dans le poumon droit. En bref, après ligature du poumon gauche, la trachée a été canulée avec un cathéter 22G. 1 ml de PBS stérile pré-froid a été lentement injecté dans le poumon et l'aspiration a été répétée trois fois. Le liquide de lavage a ensuite été recueilli puis centrifugé à 1500g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été recueilli et stocké à -80°C. Après ligature du poumon droit, le poumon gauche a été gonflé avec une solution d'OCT à une pression de 25 cmH<sub>2</sub>O, placé dans une solution d'OCT avant congélation dans de l'azote liquide et sectionnement ultérieur (coupe 6µm). Le foie a également été conservé à -20°C dans une solution d'OCT.

## **II. g Mesure du cf-DNA**

L'ADN circulant peut résulter d'une suractivation des neutrophiles (NETose ou production de pièges extracellulaires) entraînant la libération de leur matériel génétique, mais aussi de toutes les cellules potentiellement mourantes, y compris les cellules endothéliales.

La concentration de cf-DNA a été déterminée avec 10 µL de plasma à l'aide du kit d'analyse Quant-iT™ et d'un fluorimètre Qubit™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les instructions du fabricant. Après la production d'une courbe standard avec de l'ADN de thymus de veau, des échantillons de plasma (10 µL) ont été disposés dans une plaque de 96 puits, dilués avec 90 µL de TRIS-EDTA et un réactif fluorescent (100 µL) a été ajouté protégé de la lumière. La fluorescence a ensuite été mesurée ( $\lambda$  excitation=485nm,  $\lambda$  émission=535nm).

## **II. h Mesure des cytokines et des marqueurs endothéliaux**

Les concentrations de cytokines ont été mesurées à l'aide du kit Milliplex (Merck Millipore® France). Les concentrations des cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ), TNF-alpha ainsi que de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ont été déterminées dans le plasma obtenu 4 heures avant et 24 heures après la CLP, par une méthode ELISA séquentielle. Les marqueurs endothéliaux ont été mesurés par ELISA multiplexé à l'aide d'un panel cardiovasculaire (Merck Millipore® France). MMP-9, PAI-1, E-sélectine soluble, ICAM-1 soluble, VCAM-1 soluble ont été mesurés dans le plasma obtenu 4 heures avant et 24 heures après la CLP.

Dans le modèle PA, la concentration de cytokine IL6 a été déterminée dans le LBA et dans le plasma selon la même méthode ELISA.

## **II. i Extraction d'ARN et RT-qPCR en temps réel**

Le poumon est un organe important qui devient dysfonctionnel en cas de sepsis. Nous avons testé l'hypothèse que le CSL111 peut limiter ou retarder la mortalité en contrôlant l'inflammation pulmonaire par inhibition de l'expression des molécules pro-

inflammatoires pulmonaires. Des tranches de poumon ont été homogénéisées dans du réactif Trizol puis l'ARN a été isolé avec le kit Qiagen RNeasy (Qiagen, Hilden, Allemagne). Au total, 1µg d'ARN a été rétro-transcrit en ADNc avant d'être soumis à amplification en utilisant un appareil PCR Applied Biosystems 7700 (Foster City, CA, USA). Dans tous les échantillons, les concentrations des transcrits d'ARNm du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et des molécules d'adhésion E-selectin et ICAM-1, VCAM-1 ont été déterminés.

## **II. j Analyse histologique du poumon**

Des coupes congelées de 10 microns ont été fixées avec de l'acétone pendant 10 minutes pour l'immuno-histofluorescence et avec 4% de paraformaldéhyde pour la coloration à l'hématoxyline/éosine. Des anticorps anti-apoA1 humain (#178422, 1,4 mg/mL, Sigma-Aldrich®) et anti-CD68 (#HM1070 100 µg/mL, Hycult Biochem®) ont été appliqués pendant 1h30 après avoir bloqué pendant 30 minutes des sites non spécifiques avec 10% de BSA (albumine sérique bovine). Les anticorps secondaires appropriés conjugués avec de l'Alexa 488 et d'Alexa 594 respectivement ont été incubés pendant 1h30 à température ambiante. Chaque étape a été séparée par 3 lavages avec 0,05 % de Triton X100-PBS. Les lames ont été montées dans un support de montage fluorescent Dako avant analyse avec le scanner numérique de lames NanoZoomer S60 (Hamamatsu).

Un observateur en aveugle a effectué les quantifications histologiques. La positivité pour l'immunocoloration CD68 et ApoA1 et le comptage cellulaire ont été déterminés à l'aide du logiciel Image J®.

## **II. k Compte bactérien**

Il a été démontré que les HDL pouvaient se lier au LPS et favoriser leur élimination. Nous avons vérifié si l'administration de CSL111 pouvait limiter les effets du sepsis en réduisant la concentration des bactéries.

Dans le modèle de CLP, des dilutions en série de sang total ont été effectuées dans une solution saline et 100µl de ces solutions ont étéensemencées dans un milieu de culture LB Agar. Après une incubation de 24 heures à 37°C, les CFU ont été comptées afin d'évaluer la concentration bactérienne. Le même protocole a été réalisé avec des homogénats de tissus provenant du foie, des poumons, de la rate et des reins afin de déterminer le nombre de CFU.

Dans le modèle PA, une numération bactérienne a également été effectuée (foie et poumon). Les tissus ont été homogénéisés à l'aide d'un dispositif Ultra-Turrax®, puis dilués dans du PBS 1X (1 mg de tissu pour 20 ml de PBS 1X). Après centrifugation à 400g pendant 5 minutes afin d'éliminer les débris tissulaires, le surnageant a été dilué dans une solution BHI (10µl de la solution + 90µl de BHI) avant incubation à 37°C dans une plaque de 96 puits. Un spectrophotomètre automatisé (Bioscreen C, ThermoLifeScience®) a été utilisé pour surveiller les courbes de croissance. La densité optique (DO) a été lue à 600 nm à T0, T2, T4 et T16 heures.

## **II. l Marquage des Bactéries à l'Indium 111**

L'Indium 111 a été incubé avec des bactéries pendant 45 minutes. Les bactéries ont ensuite été lavées avec du sérum physiologique par centrifugation afin d'éliminer l'Indium 111 libre. Des bactéries marquées ont été alors injectées dans des souris par voie intrapéritonéale. Le même protocole a été appliqué dans les groupes CSL111 et sérum physiologique. La distribution des bactéries radioactives a été obtenue par scintigraphie à différents temps.

## **II. m Analyse statistique**

Le critère principal de notre étude était la mortalité et les analyses plasmatiques et histologiques ainsi que le marquage des bactéries à l'Indium 111 étaient nos critères secondaires.

Les courbes de survie selon les groupes de traitement ont été estimées à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier. Aucun calcul de puissance statistique n'a été effectué avant l'étude. La taille de l'échantillon pour la courbe de survie était basée sur des études antérieures (294,299,354). Les variables quantitatives ont été exprimées sous forme de médiane [écart interquartile (IQR)]. En raison d'une distribution non gaussienne, les comparaisons univariées ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney U dans le cas des comparaisons bivariées. En cas de comparaisons entre 3 groupes (sérum physiologique, CSL111 et sham), nous avons utilisé un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn. Une valeur de p inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism®.

### **III. Résultats**

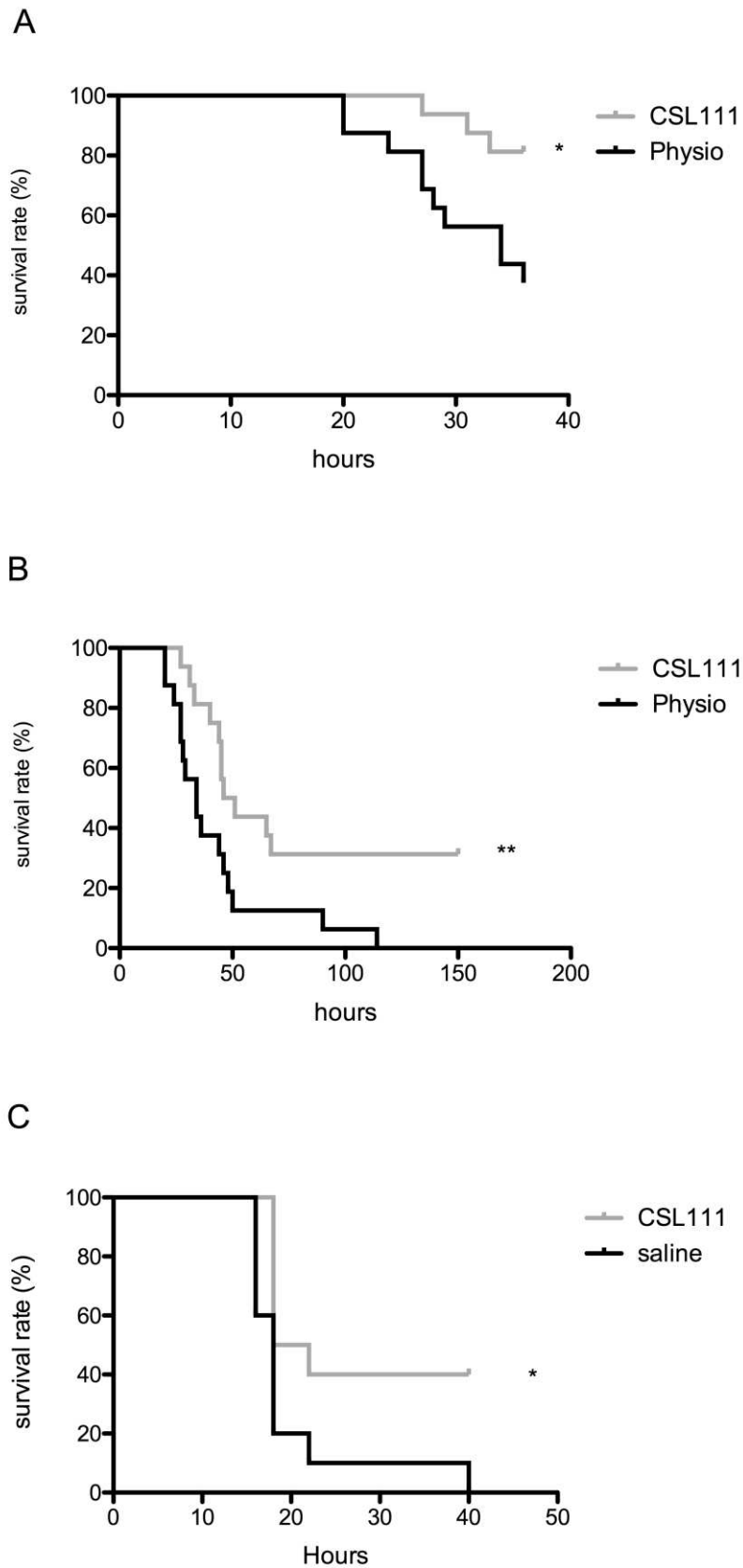
#### **III. a Effet de l'injection IV de CSL111 sur la survie dans le modèle de CLP**

Dans le groupe de souris traitées par sérum physiologique, la survie était de 38 % à 36 heures, alors qu'elle était de 81 % dans le groupe de souris traitées par CSL111 (figure 1A,  $p = 0,011$ ,  $n = 16$  souris par groupe). Après 110 heures, toutes les souris du groupe sérum physiologique étaient mortes, tandis que dans le groupe CSL111, la survie était de 31 % (figure 1B,  $p = 0,008$ ). Les souris du groupe sham ( $n=16$  souris) ont toutes survécu.

#### **III. b Effet de l'injection IV du CSL111 sur la survie dans le modèle IP**

Afin de valider les effets protecteurs des HDL, nous avons testé CSL111 dans un autre modèle de sepsis induit par l'injection IP d'*E. coli*. Toutes les souris du groupe sérum physiologique étaient mortes à 40h, alors que les souris traitées par CSL111 avaient une survie de 40 % (figure 1C,  $p = 0,011$ ,  $n = 10$  souris par groupe). Les souris sham ( $n=10$  souris) ont toutes survécu.

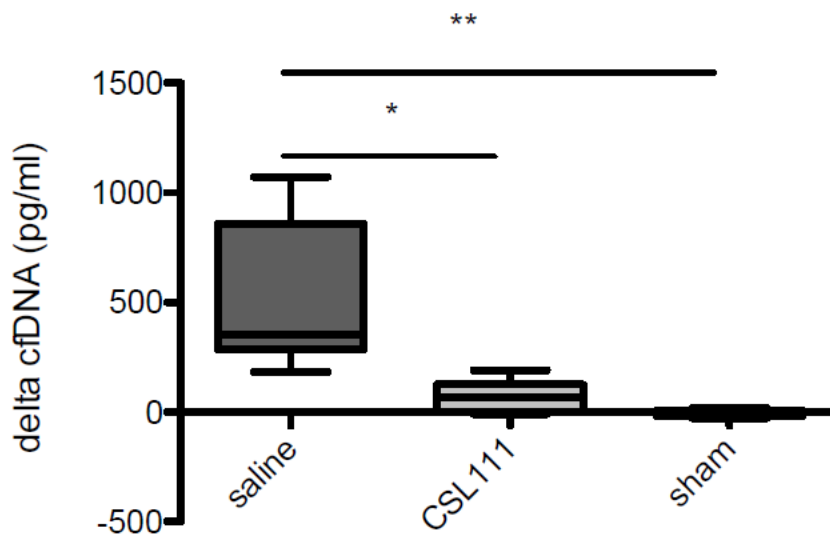




**Figure 1:** Courbes de survie des souris à 36 et 150h après la CLP (A-B) ou à 48h après l'injection de  $4 \cdot 10^7$  IAI76 *Escherichia coli* (C). N= 16 par groupe, \*p=0.01, \*\*p<0.01, test log-rank (Mantel-Cox).

### III. c ADN circulant (cf-DNA)

Nous avons mesuré le cfDNA en tant que marqueur général d'apoptose et de nécrose, reflétant potentiellement l'activation des neutrophiles via la production de NETs, à T0 et à 24 heures. Cette variation de la concentration de cfDNA (delta cfDNA, pg/ml) était statistiquement significativement plus faible dans le groupe CSL111 que dans le groupe sérum physiologique (figure 2, 68[24-123] pg/ml contre 351[333-683] pg/ml,  $p < 0,001$ ). Groupe CSL111, n=8 souris, groupe sérum physiologique, n=10 souris, groupe sham, n=9 souris.

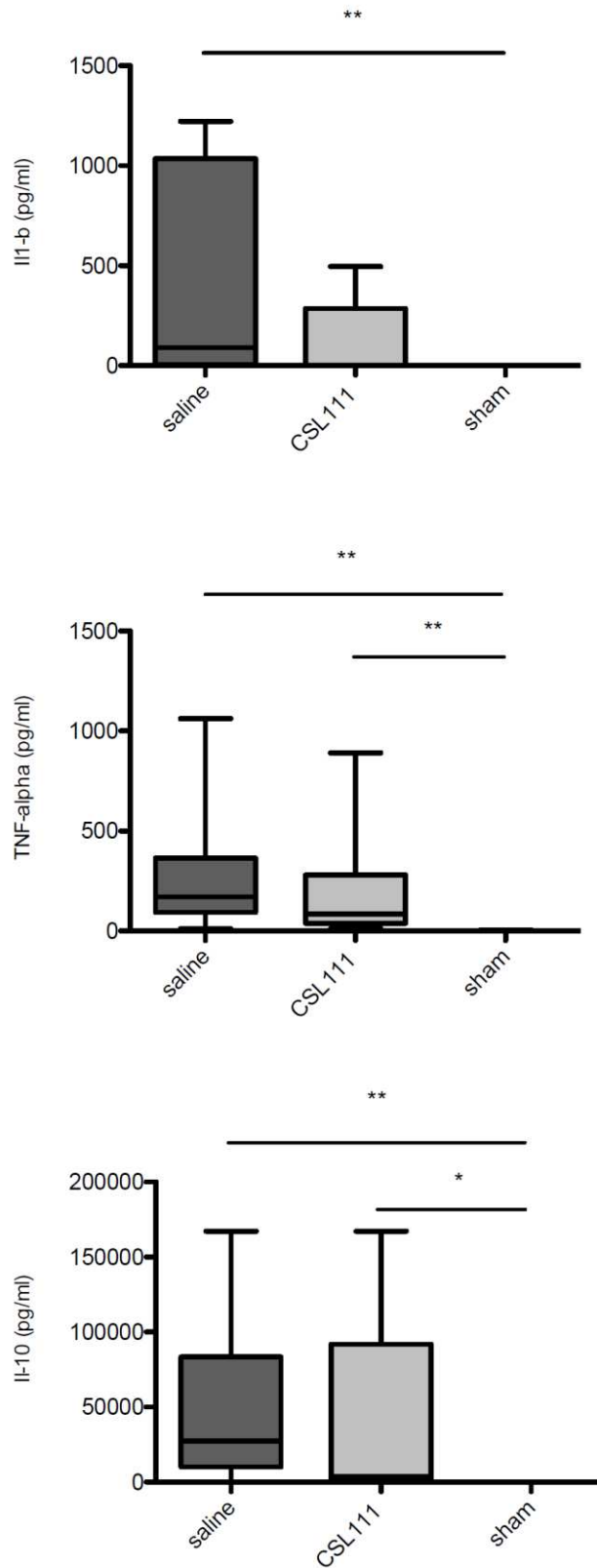


**Figure 2:** Concentration de cf-DNA (pg/ml) dans le plasma (entre 4h avant et 24h après la chirurgie). Groupe sérum physiologique, n=10, groupe CSL111, n=8, groupe sham, n=9.

### III. d Cytokines plasmatiques et dans les LBA

La CLP a induit la production d'IL1b, d'IL10 et de TNF-alpha dans le plasma comparativement aux souris sham. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le groupe CSL111 et le groupe sérum physiologique concernant IL1b, IL10 et TNF-alpha 24 heures après la CLP (Figure 3 : IL1b : 0[0-133] pg/ml contre 90[6-825] pg/ml, NS ; IL10 : 3784[1078-51292] ng/mL contre 27388[12817-52383] ng/ml, NS ; TNF- $\alpha$  : 85[44-266] pg/ml contre 171[102-346] pg/ml, NS). Groupe CSL111, n=8 souris, groupe sérum physiologique, n=10 souris, groupe sham, n=8 souris.

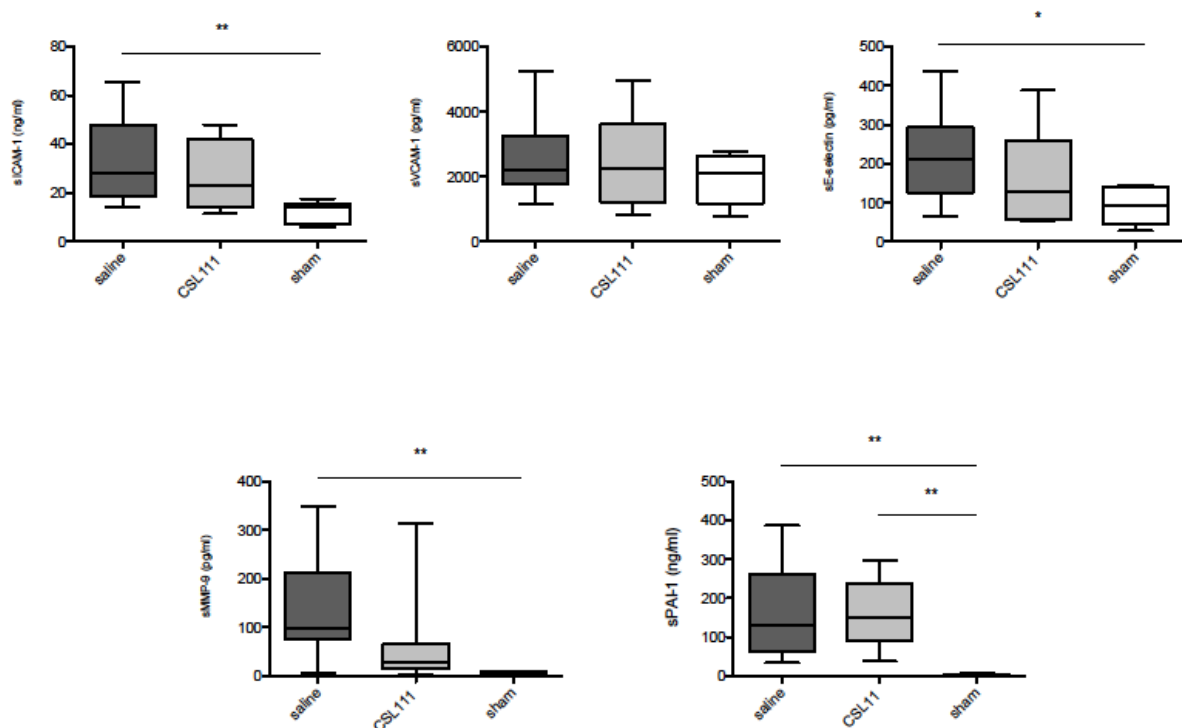
Dans le modèle PA, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les groupes CSL111 et sérum physiologique pour IL6 (plasma : CSL111 : 108[19-205] pg/mL, sérum physiologique : 119[61-5807] pg/mL,  $p=0,431$  ; BAL : CSL111 : 31[20-58] pg/mL, physiologique 37[24-240] pg/mL,  $p=0,506$ ). Groupe CSL111, n=6 souris, groupe sérum physiologique n=7 souris.



**Figure 3:** concentration plasmatique d'IL1b, IL10 et TNF-alpha (pg/ml) à 24h après la CLP. Groupe contrôle, n=10, groupe CSL111 et groupe sham, n=8 souris.

### III. e Quantification des marqueurs plasmatiques de l'inflammation et d'activation endothéliale

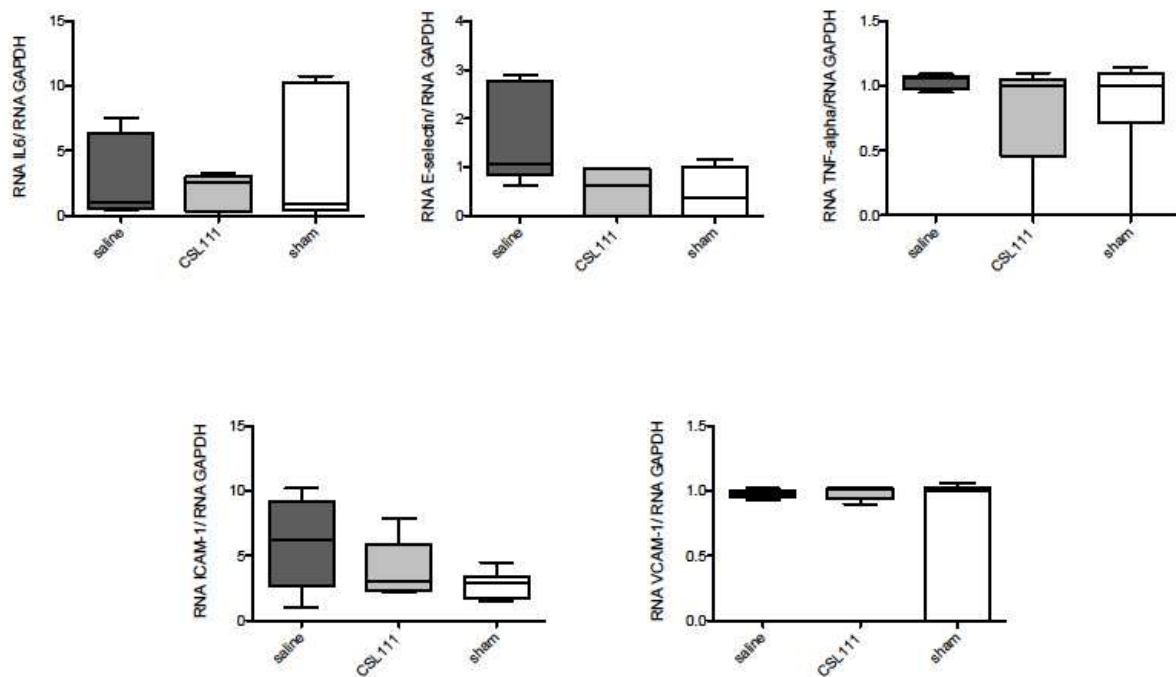
Tous les marqueurs plasmatiques testés, à l'exception du sVCAM-1, ont augmenté dans un contexte de sepsis par rapport aux souris sham. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le groupe ayant reçu le CSL111 et le groupe ayant reçu le sérum physiologique concernant sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, MMP-9 et PAI-1 24 heures après la CLP (figure S1 : sICAM-1 : 23[14-37] ng/mL contre 28[18-43] ng/mL, NS ; sVCAM-1 : 2275[1390-2823] pg/mL contre 2203[1890-3170] pg/mL, NS ; sE-sélectine : 130[56-252] pg/mL contre 212[134-262] pg/mL, NS ; MMP-9 : 28[19-54] pg/mL contre 99[80-177] pg/mL, NS ; PAI-1 : 149[92-212] ng/mL contre 132 [76-232] ng/mL, NS). Groupe CSL111, n=8 souris, groupe sérum physiologique, n=10 souris, groupe sham, n=8 souris.



**Figure S1:** Concentration plasmatique d'ICAM-1, VCAM-1, E-selectine, MMP-9 et de PAI-1 à 24h après la CLP. Groupe sérum physiologique, n=10, groupes CSL111 et sham, n=8.

### III. f Expression de l'ARNm pulmonaire d'IL6, TNF $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine

L'expression de ces gènes a été évaluée par RT-PCR. Il n'y avait aucune différence entre le groupe CSL111 et le groupe sérum physiologique concernant l'expression de l'ARNm pulmonaire d'IL6, TNF $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 et E-selectin (données supplémentaires figure S2, IL6 : 2,6[0,7-2,8] versus 1,0[0,8-5,1], NS ; TNF $\alpha$  : 1,0[0,9-1,0] contre 1,1[1,0-1,1], NS ; ICAM-1 : 3,0[2,4-3,8] contre 6,3[4,4-8,2], NS ; VCAM-1 : 1,0[0,9-1,0] contre 1,0[0,9-1,0], NS ; E-selectine : 0,6[0,0-1,0] contre 1,1[1,0-2,6], NS). Les résultats sont exprimés en ratio ARNm/ARNm sur GAPDH. Groupe CSL, n=5 souris, groupe sérum physiologique, n=5 souris, groupe sham, n=5 souris.



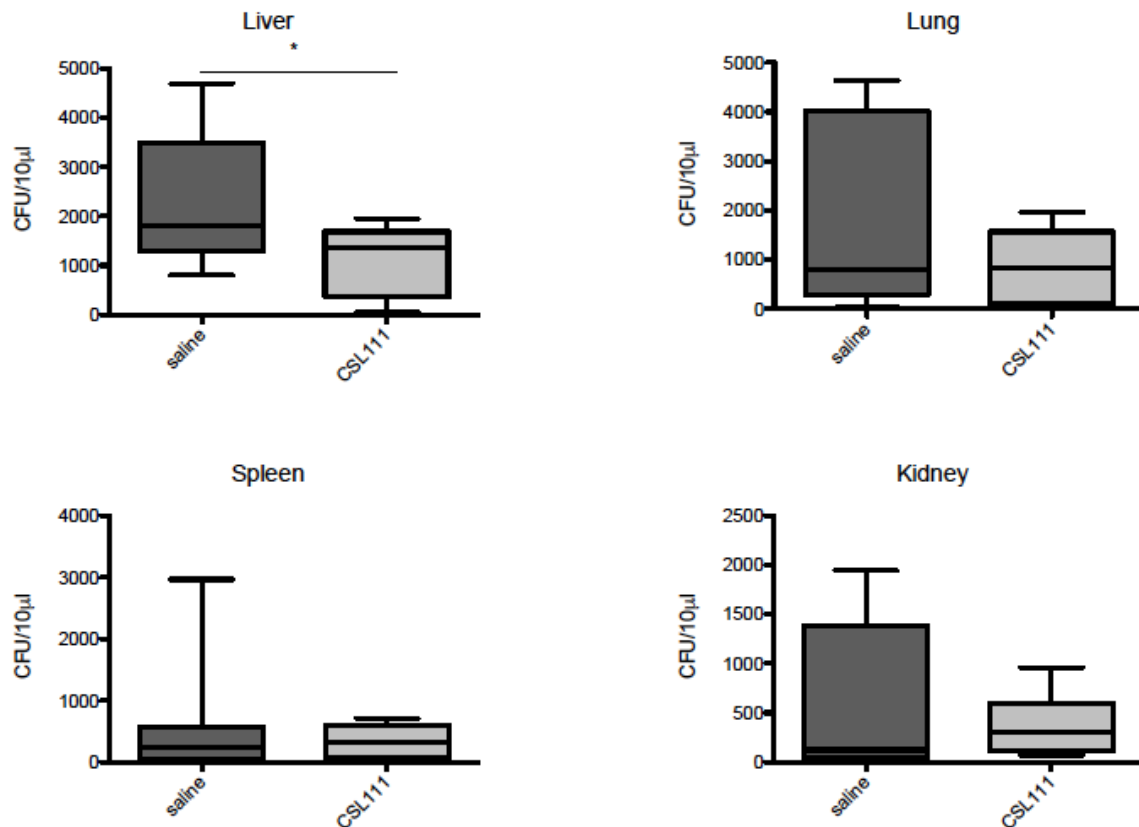
**Figure S2:** Expression de l'ARNm pulmonaire d'IL6, TNF $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine. Groupe sérum physiologique, n=10, groups CSL111 et sham, n=8.

### **III. g Bactériémie**

Les souris traitées avec le CSL111 présentaient une diminution statistiquement significative de bactériémie à 24 heures de la CLP par rapport aux souris ayant reçu une injection de sérum physiologique (200[28-2302] CFU/10 $\mu$ L de sang dans le groupe CSL111, 2500[953-3636] CFU/10 $\mu$ L de sang dans le groupe sérum physiologique,  $p=0,021$ ).  $n= 18$  souris/groupe.

### **III. h Quantification bactérienne dans le foie, les poumons, la rate et les reins**

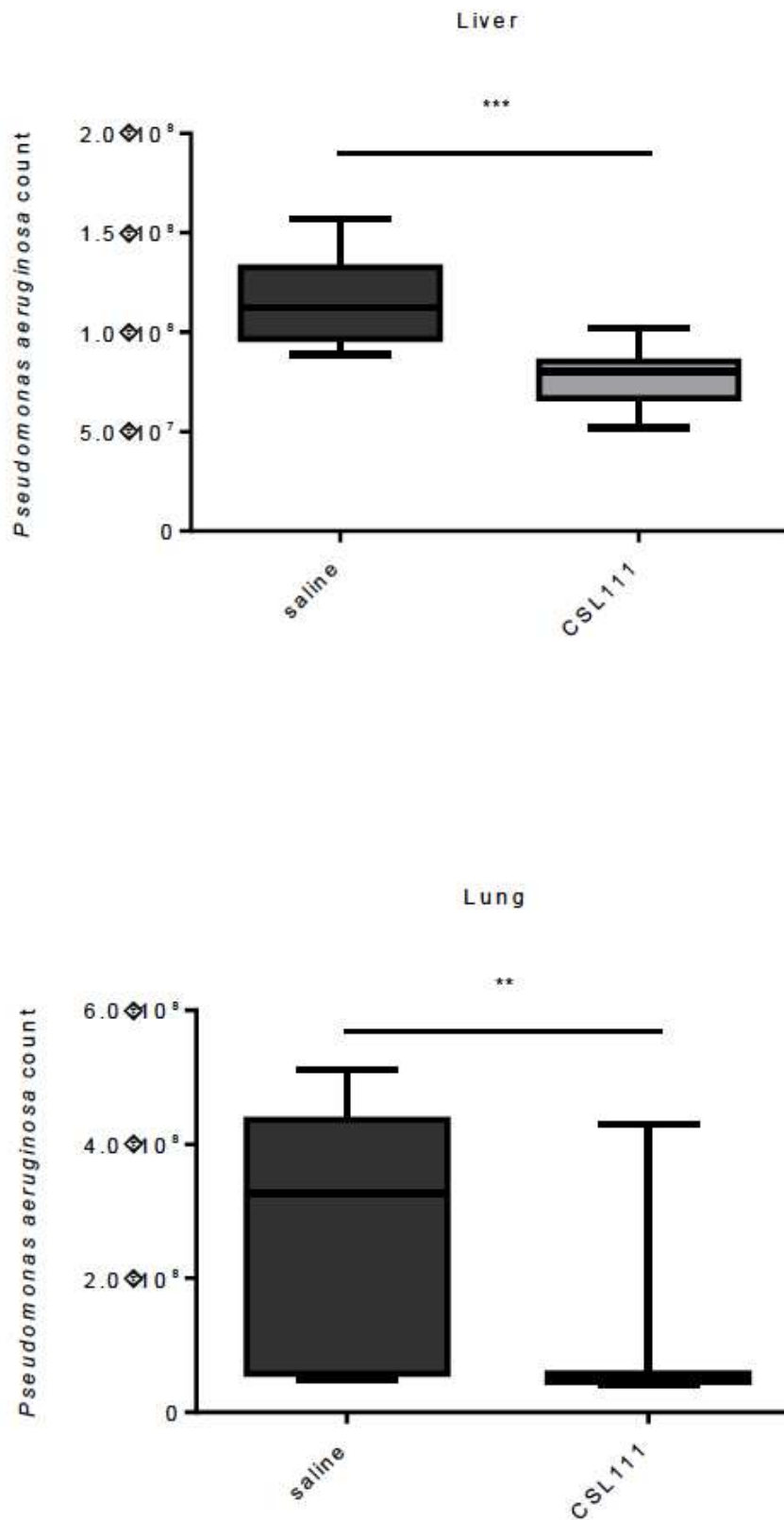
L'injection de CSL111 a entraîné une diminution statistiquement significative de la concentration bactérienne dans le foie à 24 h de la CLP par rapport au groupe sérum physiologique (1359[360-1648] CFU/10 $\mu$ L dans le groupe CSL111, 1808[1464-2720] CFU/10 $\mu$ L dans le groupe sérum physiologique ;  $p=0,031$ ). Aucune différence entre les deux groupes n'a été observée dans les poumons, la rate et les reins (poumon : 844[104-1489] CFU/10 $\mu$ L versus 807[492-3762] CFU/10 $\mu$ L,  $p=0,489$  ; rate : 320 (114-568) CFU/10 $\mu$ L contre 247 (53-503) CFU/10 $\mu$ L,  $p=0,757$  ; rein : 308 (137-336) CFU/10 $\mu$ L contre 122 (52-904) CFU/10 $\mu$ L,  $p=0,436$ ).  $n=9$  souris/groupe (Figure 4).



**Figure 4:** Nombre de bactéries (CFU/10µL). n=9 souris/groupe.

Dans le modèle PA, l'injection de CSL111 a entraîné une diminution de la concentration bactérienne dans le foie et dans les poumons à 24 heures du sepsis par rapport au groupe sérum physiologique. Dans le foie :  $8,0 \times 10^7$  [ $6,9 \times 10^7$ - $8,4 \times 10^7$ ] dans le groupe CSL111,  $1,13 \times 10^8$  [ $9,9 \times 10^7$ - $1,3 \times 10^8$ ] dans le groupe sérum physiologique,  $p < 0,001$ . Dans le poumon :  $4,9 \times 10^7$  [ $4,6 \times 10^7$ - $5,6 \times 10^7$ ] dans le groupe CSL111,  $3,2 \times 10^8$  [ $5,8 \times 10^7$ - $4,2 \times 10^8$ ] dans le groupe sérum physiologique,  $p = 0,004$ . N = 7 souris dans le groupe sérum physiologique, n = 5 souris dans le groupe CSL111. Figure 5.

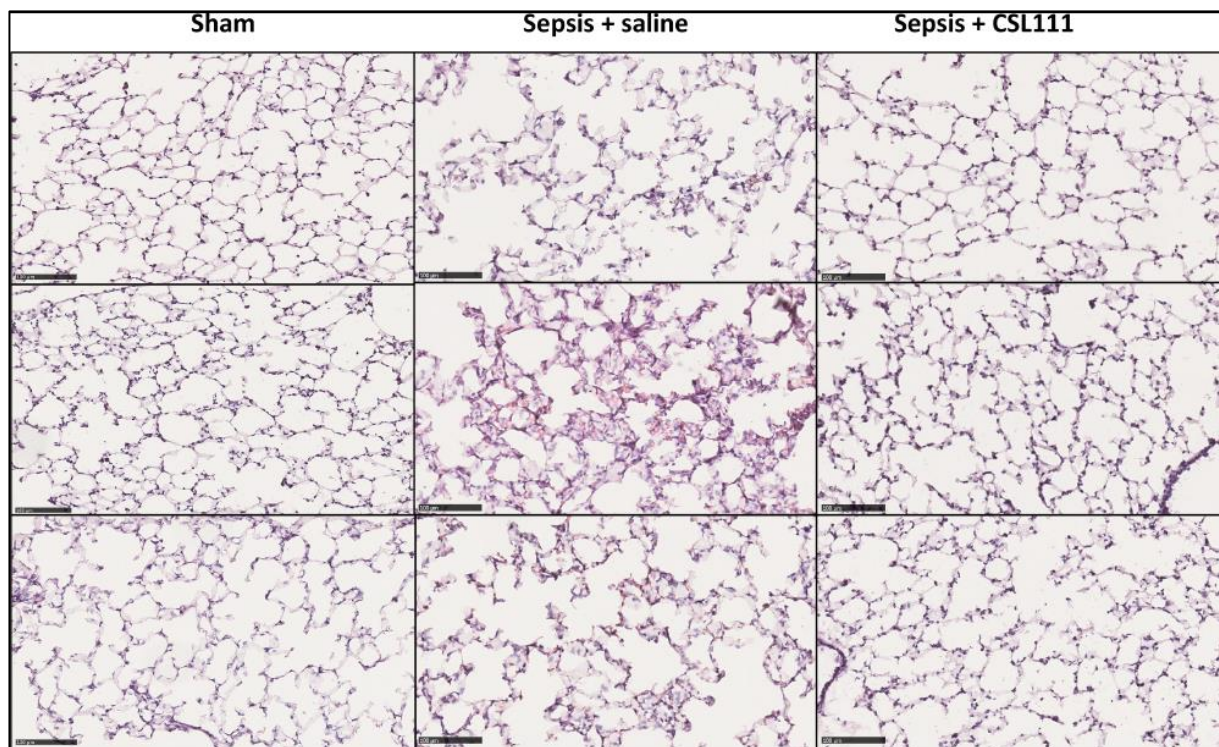




**Figure 5:** Nombre de bactéries *Pseudomonas aeruginosa* dans le foie et le poumon, 24 h après le modèle de pneumonie. n=7 souris dans le groupe sérum physiologique, n=5 dans le groupe CSL111. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

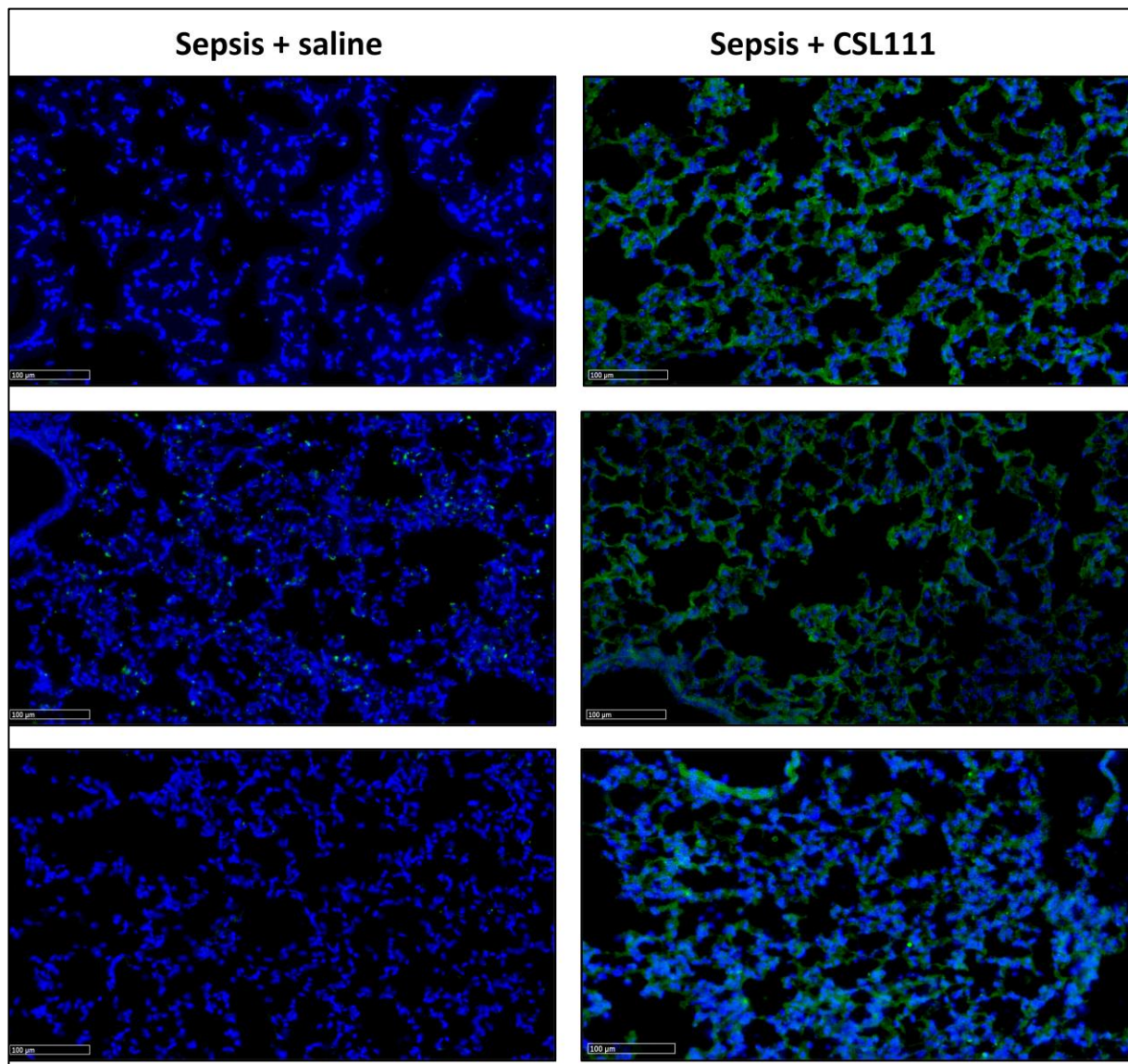
### III. i Évaluation histologique et immunodétection d'ApoA1 et de CD68 au niveau des poumons

La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a montré une augmentation de la destruction alvéolaire et de l'infiltration par les cellules inflammatoires chez les souris du groupe sérum physiologique comparativement aux souris traitées avec du CSL111 (rapport cellules/zone totale : 0,191[0,137-0,196] dans le groupe sérum physiologique, 0,036[0,032-0,039] dans le groupe CSL111, 0,050[0,045-0,061] dans le groupe sham,  $p=0,011$ ) ( $n=3$  souris/groupe, figure 6).

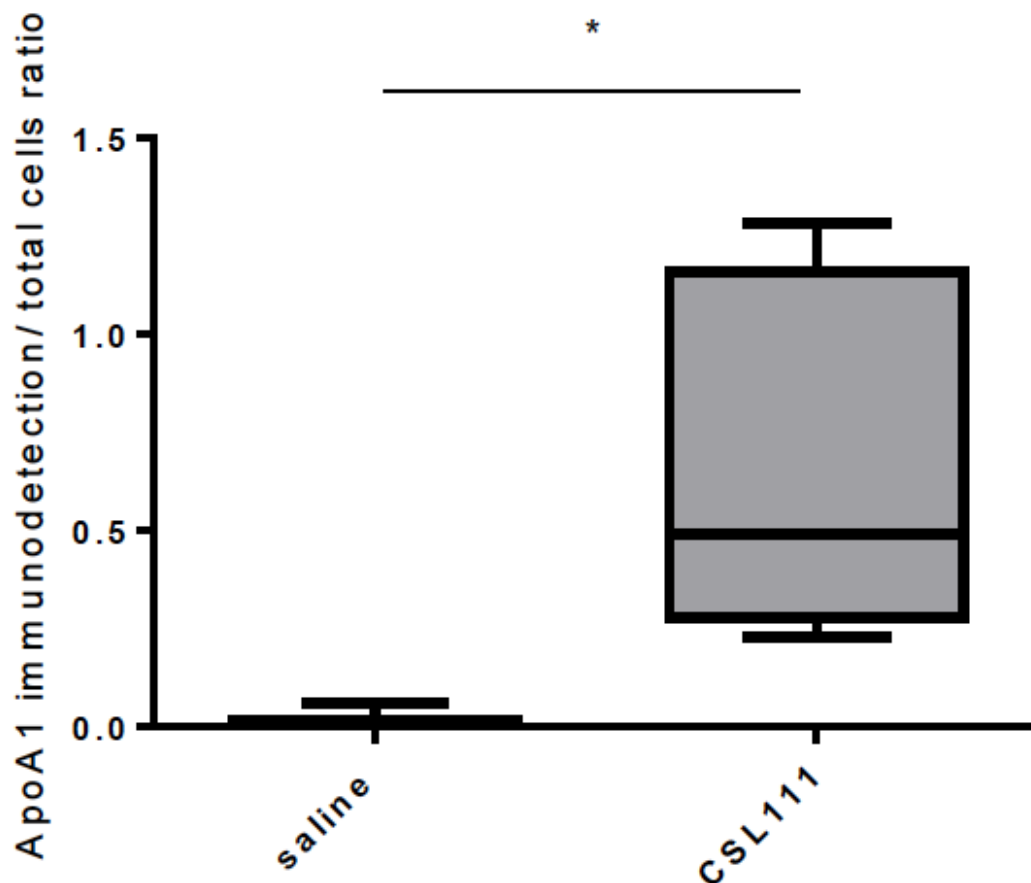


**Figure 6:** Histologie pulmonaire, coloration à l'hématoxyline-éosine, la barre noire représente 100 µm. ( $n=3$ /groupe).

Dans le modèle de CLP, l'analyse immunohistologique des poumons septiques 24 heures après l'injection intraveineuse de CSL111 ou de sérum physiologique démontre que l'apoA-I atteint et s'accumule dans le tissu pulmonaire de souris injectées avec des HDL, ce qui suggère que les particules de HDL peuvent localement exercer leur effet protecteur (rapport zone immunopositive ApoA-I / cellules : 0,49 [0,36-1,11] chez les souris du groupe CSL111 contre 0,02[0,01-0,03] chez les souris du groupe sérum physiologique,  $p=0,016$ , figure 7 et S3).

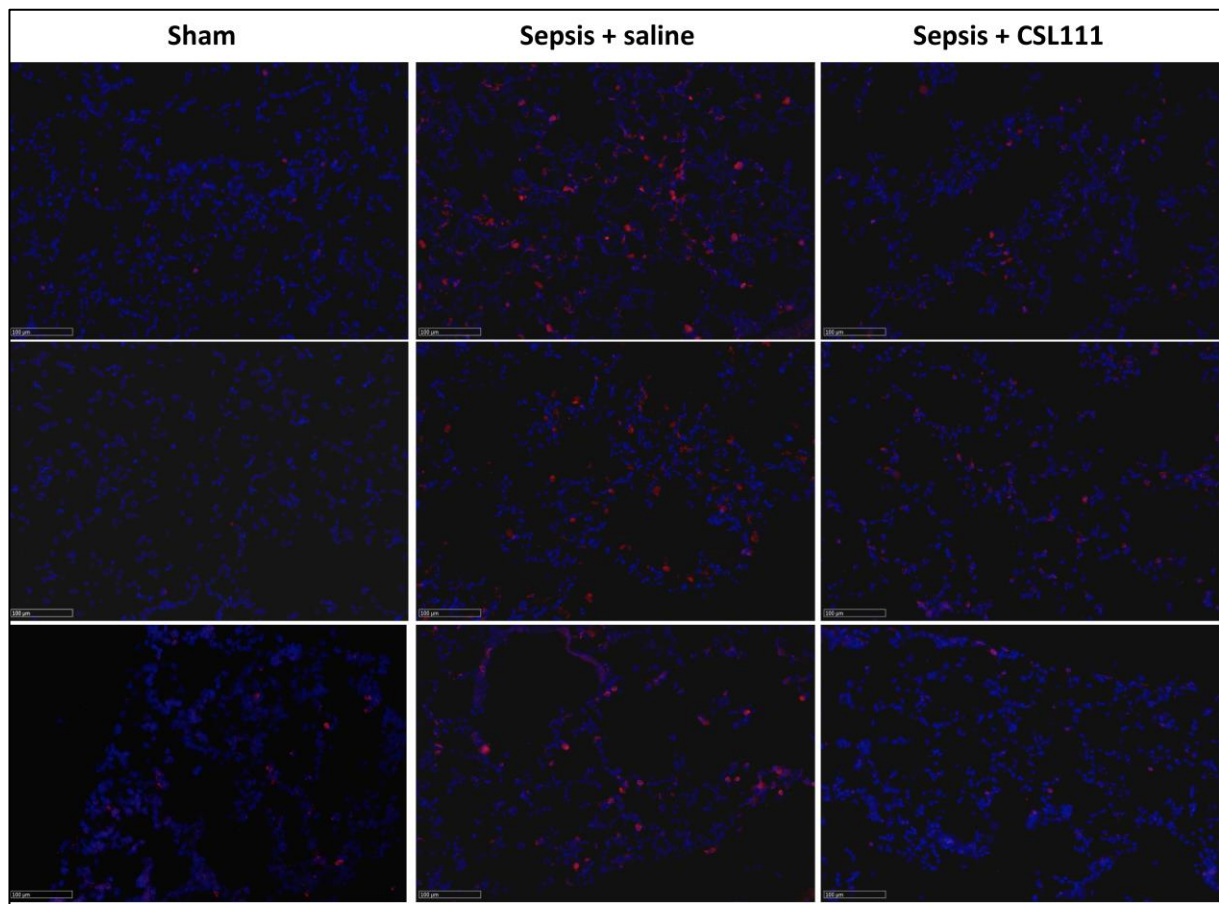


**Figure 7:** Immunodétection d'ApoA1 dans le poumon. Les noyaux sont colorés avec du DAPI (bleu), l'ApoA1 apparaît en vert (Anticorps secondaire Alexa 488). La barre noire représente 100 μm. (n=3/groupe).

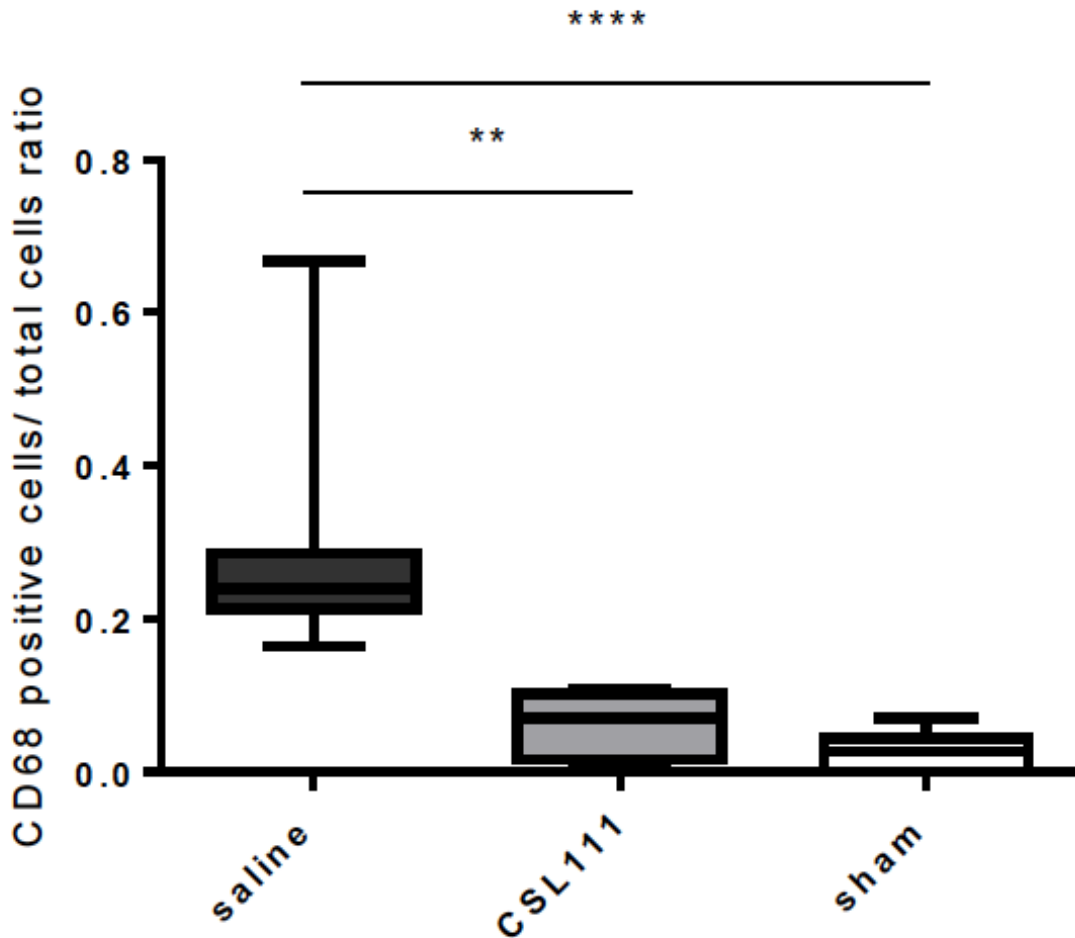


**Figure S3:** rapport immunodétection d'ApoA1/ nombre de cellules dans le poumon 24h après la CLP. n=3/groupe. \*p<0.05.

L'immunodétection des macrophages CD68-positifs montre une accumulation accrue statistiquement significative de ces cellules inflammatoires dans le groupe sérum physiologique par rapport au groupe CSL111 et au groupe sham (rapport aire/cellules immunopositives CD68 : solution saline : 0,24[0,22-0,27] ; groupe CSL111 : 0,07[0,01-0,09] ; groupe sham 0,02[0,00-0,04], p<0,0001). L'injection de HDL a limité de façon marquée le recrutement des macrophages en conditions septiques (figures 8 et S4).



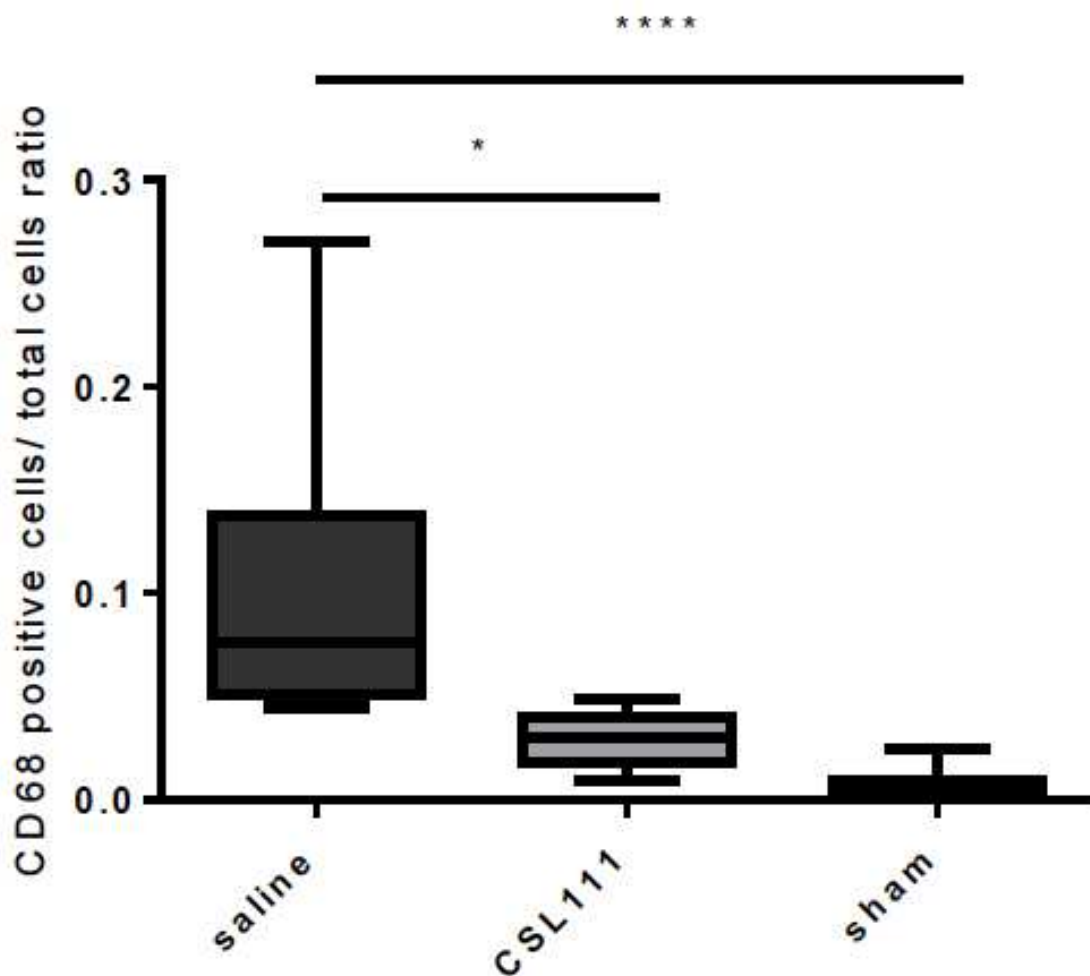
**Figure 8:** Immunodétection de CD68 dans le poumon. Les noyaux sont colorés avec du DAPI (bleu), CD68 apparaît en rouge (Anticorps secondaire Alexa 594). La barre noire représente 100 µm. (n=3/groupe).



**Figure S4:** Rapport cellules positives pour le CD68 / nombre total de cellules dans le poumon 24h après la CLP. n=3/groupe. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001

Dans le modèle PA, la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a montré une augmentation de la destruction alvéolaire et de l'infiltration par les cellules inflammatoires dans le groupe de souris injectées avec du sérum physiologique comparativement aux souris traitées avec du CSL111 et le groupe sham (rapport cellules/zone totale : 0.042[0,039-0,047] dans le groupe salin, 0,013[0,013-0,014] dans le groupe CSL111, 0,013[0,009-0,017] dans le groupe sham, p<0,001) (n=3 souris/groupe).

Dans le modèle PA, les souris injectées avec du CSL111 présentaient moins de cellules CD68-positives que les souris du groupe sérum physiologique. Il n'y avait pas de différence entre les souris CSL111 et les souris sham (rapport zone immunopositive/cellules CD68 : sérum physiologique : 0,067[0,054-0,127] ; groupe CSL111 : 0,030[0,022-0,037] ; groupe sham 0,004[0,003-0,009],  $p < 0,0001$ ),  $n=3$  souris/groupe, figure 9.

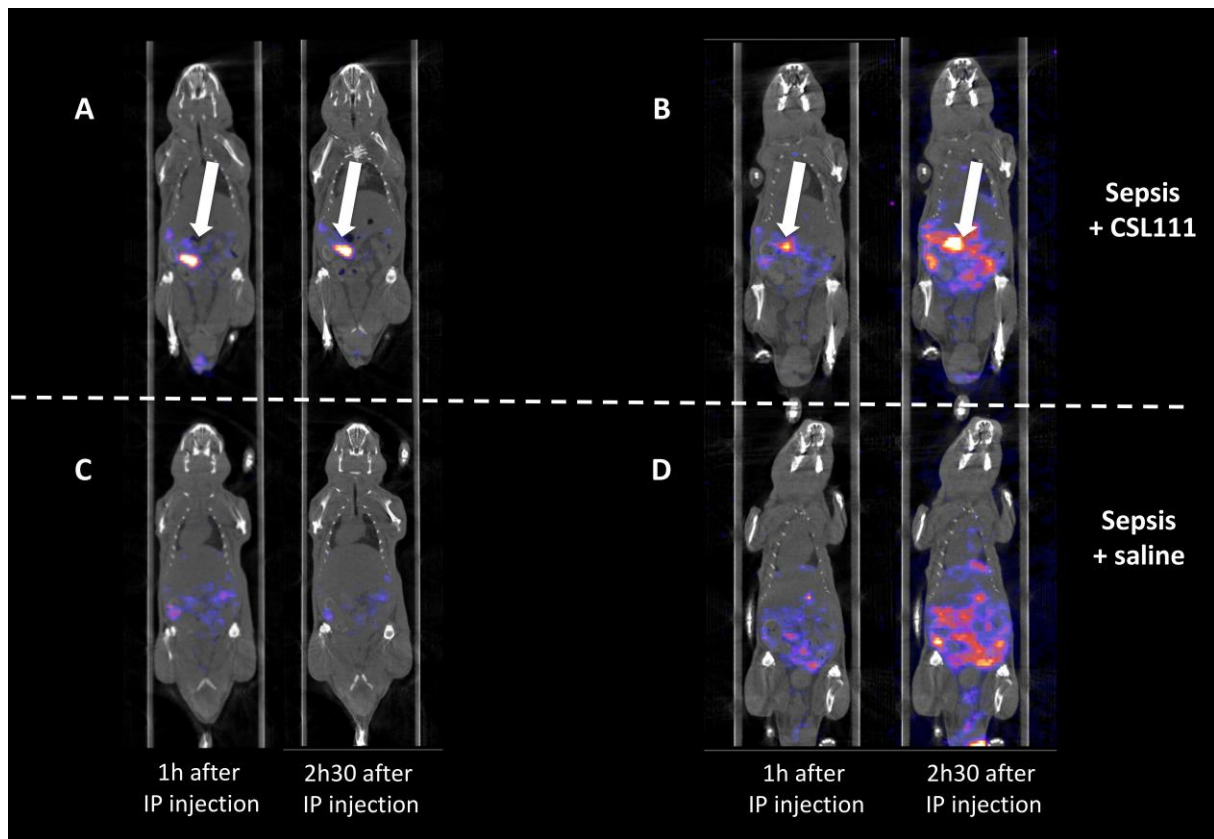


**Figure 9:** Rapport cellules immunopositives pour le CD68/ nombre total de cellules dans les poumons 24h après l'injection intra-pulmonaire de *Pseudomonas aeruginosa*.  $n=3$  souris/groupe. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



### III j Marquage des bactéries à l'Indium111

La scintigraphie a montré que les bactéries ont principalement une localisation intrapéritonéale 1h après l'injection IP. À 2h30, dans le groupe de souris traitées avec du CSL111, les bactéries ont une localisation épigastrique vraisemblablement la vésicule biliaire. Dans le groupe recevant une solution de sérum physiologique, les bactéries marquées étaient essentiellement localisées en position intrapéritonéale et dans les testicules. Il n'y a pas eu d'accumulation en épigastrique dans ce groupe de souris. N=2 souris/groupe (figure S5).



**Figure S5:** Scintigraphie après injection intra-péritonéale des bactéries *E. coli* marquées à l'Indium<sup>111</sup>. A-B: souris septiques après injection de CSL111; C-D: souris septiques après injection de sérum physiologique. Les flèches blanches indiquent la région épigastrique (n=2 /groupe).

#### IV. Discussion :

Nous avons donc montré dans ce travail que l'injection de rHDL permettait d'augmenter la survie dans plusieurs modèles expérimentaux de sepsis murins. Ces résultats sont en accord avec les différentes études expérimentales testant l'efficacité soit des rHDL soit des peptides mimétiques de l'ApoA1 (221,301,355).

L'originalité de notre étude, a été, en plus des sepsis à point de départ abdominal (CLP et IP) de tester le CSL111® dans un modèle murin de pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa*. A notre connaissance, il s'agit de la première étude testant ce produit dans un modèle de pneumonie.

En plus de la survie et des résultats plasmatiques positifs en faveur de l'injection de CSL111®, nous avons mis en évidence des effets protecteurs de ce produit au niveau du tissu pulmonaire. Nous avons montré, à l'instar de nombreuses études expérimentales que l'injection de CSL111® permettait de limiter l'infiltration de cellules de l'inflammation et les destructions alvéolaires (221,355). Avec une diminution significative de l'immunomarquage CD68 au sein du parenchyme pulmonaire, nous avons montré en plus des constatations histologiques, que l'injection de CSL111® avait certainement des vertus anti-inflammatoire avec une diminution significative du recrutement macrophagique au sein même du tissu.

Néanmoins, notre étude n'a pas permis de montrer une diminution à 24h de la concentration de cytokines chez les souris traitées par CSL111®. En comparant avec les différentes études publiées, il s'avère que l'expression des cytokines pro et anti-inflammatoires soit temps et modèle -dépendant. En effet, l'injection de rHDL dans un modèle endotoxinique chez le rat n'a pas permis de réduire le niveau de TNF- $\alpha$  (221). Zhang *et al.* ont montré une diminution de IL-6 12h après une CLP mais pas à 24h dans une étude

étudiant l'intérêt d'un peptide mimétique de l'ApoA1 (301). Dai *et al.* ont aussi montré une diminution de TNF- $\alpha$  à 2h mais pas à 6h (355). Probablement que le délai de 24h dans notre travail était trop important.

En plus des différents effets anti-inflammatoires, les HDL sont capables de se fixer au LPS et de le neutraliser (296,356). Avec une diminution des bactériémies à 24h et une diminution du nombre de bactéries au sein des tissus, notre étude met en relief cette propriété. En effet, notre hypothèse est que les HDL vont capter le LPS permettant d'augmenter l'élimination hépatique des bactéries via une excrétion biliaire. Après avoir marquée les bactéries à l'indium 111, nous avons en effet montré que dans le groupe de souris traitées par rHDL, ces bactéries étaient retrouvées au niveau de la vésicule biliaire.

Notre étude a un certain nombre de limites :

- tout d'abord, nous n'avons pas monitoré les paramètres hémodynamiques chez nos souris.
- deuxièmement, nous n'avons pas utilisé de paramètres permettant de mesurer la tolérance des organes (par exemple données de fonction rénale ou hépatique).
- enfin, l'injection de CSL111<sup>®</sup> a été effectuée à 2h du sepsis. Une injection plus tardive aurait pu être également très informative.

En pratique clinique, les HDL reconstituées ont été testées dans plusieurs pathologies incluant en particulier des patients diabétiques ou/et ayant de l'athérosclérose (351,357–359). L'étude multicentrique ERASE qui consistait en une administration de CSL111 chez des patients ayant une coronaropathie n'a pas montré de différence en terme de volume de plaque d'athérome par rapport à un groupe placebo (304).

Concernant, le sepsis, à notre connaissance aucune étude humaine randomisée comparant des HDL reconstituées à un placebo n'a été réalisée. Néanmoins, deux études de choc endotoxinique chez des volontaires sains ont montré une diminution des paramètres relatifs à l'inflammation dans le groupe de volontaires recevant des HDL reconstituées (310,311). De plus, de nombreuses études ont montré une diminution drastique des concentrations de HDL au cours du sepsis (252,254,327). Dans ce contexte, la supplémentation en HDL pourrait représenter un potentiel traitement à tester dans le sepsis chez l'homme.



# DISCUSSION GENERALE

Pour résumer cette thèse :

- En comparant deux populations inflammatoires de réanimation, des patients polytraumatisés et des patients en choc septique, nous avons montré que les concentrations de HDL à l'admission en réanimation étaient diminuées dans cette dernière population alors qu'elles étaient normales chez les patients traumatisés.
- Après avoir réalisé des électrophorèse non dénaturantes (technologie Lipoprint®) sur plasma, nous avons mis en évidence une modification de structure des HDL chez des patients en choc septique que nous avons comparé à des patients non-septique de réanimation. Il y avait davantage de particules de HDL de grande taille par rapport aux HDL de plus petite taille, reflet potentiel d'un état dysfonctionnel au cours du sepsis.
- Une étude protéomique sur plasma de patients septiques a retrouvé une diminution drastique de nombreuses apolipoprotéines en lien avec les HDL.
- Une étude de cohorte de patients hospitalisés en réanimation pour sepsis sévère ou choc septique a permis de conclure à l'absence de lien statistique entre les concentrations de HDL-C à l'admission en réanimation et la mortalité des patients.
- Enfin, nous avons montré que l'administration de HDL humaines reconstituées dans trois modèles murins de sepsis a permis de diminuer la mortalité, de diminuer de nombreux marqueurs de l'inflammation et les concentrations bactériennes au niveau plasmatique et tissulaire.

De nombreuses études ont montré que la concentration de HDL-C était diminuée au cours du sepsis et que cette concentration était associée au devenir du patient (252–254,258,327). La consommation importante, la fuite capillaire massive, la dysfonction hépatique et la dérégulation des récepteurs aux HDL au cours du sepsis permettent en partie d'expliquer cette diminution de concentration de cette lipoprotéine. Or, dans la première partie de la thèse, dans le sous-groupe de patients septiques (n=50), nous n'avons pas trouvé de lien entre le niveau de HDL et la mortalité des patients. Dans ce contexte, nous avons mené à bien une étude prospective observationnelle colligeant tous les patients hospitalisés dans notre réanimation pour sepsis. Malgré un effectif important (n=205), nous n'avons pas trouvé de lien entre la concentration de HDL-C et la mortalité. La concentration de HDL était néanmoins corrélée avec la morbidité (score SOFA à J1 et J3 et nombre de jours vivants sans ventilation mécanique). La concentration de HDL à l'admission était prédictive d'un mauvais pronostic à J3 (score SOFA supérieur à 6 ou décès du patient).

Reposant sur ces observations, notre hypothèse de travail est que la concentration effondrée de HDL-C n'est probablement pas suffisante pour expliquer une mauvaise évolution clinique d'un patient hospitalisé pour sepsis en réanimation, en particulier dans des services de réanimation performants. Des paramètres de fonctionnalité des HDL en condition septique tels que des modifications de taille ou de composition pourraient potentiellement nous aider à mieux caractériser nos patients, nous permettre de mieux appréhender leur devenir et en particulier la morbi-mortalité et potentiellement leur proposer des thérapeutiques personnalisées. A l'instar de certaines pathologies inflammatoires chroniques comme l'athérosclérose ou certaines maladies auto-immunes, au cours desquelles la dysfonction des HDL a potentiellement des implications cliniques sur le



devenir des patients, nous pensons en effet que la dysfonction des HDL peut avoir un impact sur la morbi-mortalité lors d'un épisode septique. D'ailleurs, le terme « HDL dysfonctionnelles » est apparu récemment dans la littérature comme un nouveau concept décrit au cours du sepsis (272,274,281,329).

Nous avons caractérisé des différences significatives de taille de HDL entre des patients septiques et des patients contrôle hospitalisés en réanimation avec des particules de plus grosse taille dans le groupe septique. En terme de fonctionnalité, les petites particules de HDL sont connues pour avoir des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires plus prononcées que les plus grosses chez des patients atteints de pathologies cardio-vasculaires (317) . Nos travaux sont en accord avec l'équipe de De la Llera-Moya *et al.* qui ont montré une diminution des particules de HDL pré- $\beta$  et celles de petite et de moyenne taille dans une évaluation par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire chez des volontaires sains à qui une injection de LPS était réalisée pour induire un choc endotoxique (268).

En plus de ces différences de taille des HDL, nous avons entrepris un travail de caractérisation des lipoprotéines au cours du sepsis. Malheureusement, suite à un problème technique rendant l'ultracentrifugeuse indisponible en cours de thèse, nous n'avons pas pu isoler les HDL pour une analyse protéomique. Néanmoins, une analyse ciblée par spectrométrie de masse sur plasma a montré à la fois une diminution drastique des apolipoprotéines dans le plasma des patients septiques mais aussi des corrélations remaniées entre ces apolipoprotéines (habituellement en lien avec les HDL) et la

concentration de HDL-C, ce qui pourrait être le reflet d'une certaine dysfonction survenant au cours du sepsis.

Enfin, dans un but translationnel, après la caractérisation de modifications de fonction et de structure, nous avons voulu tester l'injection de HDL reconstituées chez des souris septiques. A l'instar de nombreuses études, nous avons montré que l'injection de HDL humaines reconstituées dans trois modèles murins de sepsis a mis en évidence une diminution de la mortalité, une diminution de nombreux marqueurs de l'inflammation et des concentrations bactériennes au niveau plasmatique et tissulaire (221,300,301). Par rapport aux autres études, nous avons, à notre connaissance, pour la première fois montré l'efficacité de ces HDL reconstituées dans un modèle expérimental de pneumonies. Par ailleurs, nos expériences d'immunomarquage de l'ApoA1 au niveau tissulaire et en particulier au niveau du poumon, ont permis de montrer qu'après l'injection de ces HDL, ces dernières allaient atteindre directement les tissus et y exercer leurs effets pléiotropes.

Les résultats encourageants obtenus au cours de cette thèse nous permettent d'envisager un certain nombre de perspectives :

Sur le plan fondamental, il nous semble indispensable de poursuivre des travaux permettant de caractériser la dysfonction des HDL. L'étude du protéome de particules d'HDL isolées est à cet égard indispensable. L'étude de l'effet anti-oxydant des HDL à la fois par leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL et à la fois par la facilitation à la production de NO en condition normale, mérite d'être réalisée et en particulier au cours du sepsis où il y a une production exacerbée de radicaux libres. Par ailleurs, nous avons l'intime conviction que la captation du LTA et du LPS par les HDL est un mécanisme essentiel au cours des pathologies infectieuses. La caractérisation des mécanismes de captation et d'élimination des bactéries nous semble primordial. Au cours de ce travail, en marquant des bactéries à l'Indium 111 secondairement injectées en intra-péritonéal et après l'administration de CSL111, nous avons montré que les HDL favoriseraient l'élimination hépatique des bactéries. Cependant ce travail préliminaire (n= 2 souris) mérite un approfondissement.

Sur le plan clinique, plusieurs pistes sont à poursuivre : nous avons trouvé un lien statistique entre la concentration de HDL-C à l'admission et la mortalité dans le sous-groupe de patients ayant un sepsis pleuro-pulmonaire. La réalisation d'une nouvelle étude observationnelle focalisée sur les sepsis pleuro-pulmonaires semble pertinente. Enfin, avec les résultats positifs de nombreuses études expérimentales et de la nôtre testant en pré-clinique l'administration de HDL reconstituées au cours du sepsis, un essai clinique randomisé chez l'homme pourrait être intéressant.

En conclusion de ce travail de thèse, la dysfonction des particules de HDL en condition septique est une réalité ayant potentiellement des conséquences néfastes pour les patients en terme de morbi-mortalité. Les modifications quantitatives et qualitatives des HDL observées au cours du sepsis empêchant en partie ces particules d'exercer leurs propriétés endothélio-protectrices et anti-inflammatoires aboutissent à la conclusion que l'administration de particules fonctionnelles semble être une option thérapeutique séduisante. Néanmoins, avant la réalisation d'un essai randomisé en condition septique chez l'homme testant l'efficacité des HDL thérapeutiques, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et des modifications structurales et fonctionnelles de ces particules semble indispensable.



## Bibliographie :

1. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1481–3.
2. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R et al: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013, 39(2):165-228.
3. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet Lond Engl*. 2018 07;392(10141):75–87.
4. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*. 2013 May;41(5):1167–74.
5. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on “sepsis-related problems” of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*. 1998 Nov;26(11):1793–800.
6. Michalek SM, Moore RN, McGhee JR, Rosenstreich DL, Mergenhagen SE. The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. *J Infect Dis*. 1980 Jan;141(1):55–63.
7. Le JM, Vilcek J. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 1989 Dec;61(6):588–602.
8. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991–1045.
9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
10. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Feb 1;193(3):259–72.
11. Jawad I, Lukšić I, Rafnsson SB. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *J Glob Health*. 2012 Jun;2(1):010404.
12. Becker JU, Theodosis C, Jacob ST, Wira CR, Groce NE. Surviving sepsis in low-income and middle-income countries: new directions for care and research. *Lancet Infect Dis*. 2009 Sep;9(9):577–82.
13. Murray CJL, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med*. 2013 Aug 1;369(5):448–57.
14. Mayanja BN, Todd J, Hughes P, Van der Paal L, Mugisha JO, Atuhumuza E, et al. Septicaemia in a population-based HIV clinical cohort in rural Uganda, 1996-2007: incidence, aetiology, antimicrobial drug resistance and impact of antiretroviral therapy. *Trop Med Int Health TM IH*. 2010 Jun;15(6):697–705.
15. Gordon MA, Walsh AL, Chaponda M, Soko D, Mbwini M, Molyneux ME, et al. Bacteraemia and mortality among adult medical admissions in Malawi--predominance of non-typhi salmonellae and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect*. 2001 Jan;42(1):44–9.

16. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA*. 2014 Jul 2;312(1):90–2.
17. Lagu T, Rothberg MB, Shieh M-S, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. What is the best method for estimating the burden of severe sepsis in the United States? *J Crit Care*. 2012 Aug;27(4):414.e1-9.
18. Rhee C, Gohil S, Klompas M. Regulatory mandates for sepsis care--reasons for caution. *N Engl J Med*. 2014 May 1;370(18):1673–6.
19. Whittaker S-A, Mikkelsen ME, Gaiieski DF, Koshy S, Kean C, Fuchs BD. Severe sepsis cohorts derived from claims-based strategies appear to be biased toward a more severely ill patient population. *Crit Care Med*. 2013 Apr;41(4):945–53.
20. Iwashyna TJ, Angus DC. Declining case fatality rates for severe sepsis: good data bring good news with ambiguous implications. *JAMA*. 2014 Apr 2;311(13):1295–7.
21. McPherson D, Griffiths C, Williams M, Baker A, Klodawski E, Jacobson B, et al. Sepsis-associated mortality in England: an analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010. *BMJ Open*. 2013 Aug 2;3(8).
22. Kaukonen K-M, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*. 2014 Apr 2;311(13):1308–16.
23. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17;348(16):1546–54.
24. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006 Feb;34(2):344–53.
25. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303–10.
26. Lelubre C, Vincent J-L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol*. 2018 Jul;14(7):417–27.
27. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primer*. 2016 Jun 30;2:16045.
28. Rosadini CV, Kagan JC. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr Opin Immunol*. 2017 Feb;44:14–9.
29. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012 Sep;249(1):158–75.
30. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013 Nov 21;369(21):2063.
31. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):36–44.
32. Bierhaus A, Nawroth PP. Modulation of the vascular endothelium during infection--the role of NF-kappa B activation. *Contrib Microbiol*. 2003;10:86–105.
33. Parikh SM. Dysregulation of the angiopoietin-Tie-2 axis in sepsis and ARDS. *Virulence*. 2013 Aug 15;4(6):517–24.
34. Guo R-F, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:821–52.
35. Laursen NS, Magnani F, Gottfredsen RH, Petersen SV, Andersen GR. Structure, function and control of complement C5 and its proteolytic fragments. *Curr Mol Med*. 2012 Sep;12(8):1083–97.
36. Ward PA. The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *J Innate Immun*. 2010;2(5):439–45.

37. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, Ang D, Bihorac A, McKinley BA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012 Jun;72(6):1491–501.
38. Vanzant EL, Lopez CM, Ozrazgat-Baslanti T, Ungaro R, Davis R, Cuenca AG, et al. Persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome after severe blunt trauma. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014 Jan;76(1):21–9; discussion 29–30.
39. Hu D, Ren J, Wang G, Gu G, Chen J, Zhou B, et al. Persistent inflammation-immunosuppression catabolism syndrome, a common manifestation of patients with enterocutaneous fistula in intensive care unit. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014 Mar;76(3):725–9.
40. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 2007 Oct;28(10):429–36.
41. Horiguchi H, Loftus TJ, Hawkins RB, Raymond SL, Stortz JA, Hollen MK, et al. Innate Immunity in the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome and Its Implications for Therapy. *Front Immunol.* 2018;9:595.
42. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care Lond Engl.* 2011 Jul 28;15(4):R183.
43. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, et al. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PloS One.* 2014;9(2):e98819.
44. Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg.* 2009 Jun;108(6):1841–7.
45. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA.* 2011 Dec 21;306(23):2594–605.
46. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med Camb Mass.* 2011 Apr;17(3–4):281–92.
47. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1463–74.
48. Taneja R, Sharma AP, Hallett MB, Findlay GP, Morris MR. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock Augusta Ga.* 2008 Dec;30(6):618–22.
49. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest.* 1991 Nov;88(5):1747–54.
50. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 2013 Mar;41(3):820–32.
51. Hashiba M, Huq A, Tomino A, Hirakawa A, Hattori T, Miyabe H, et al. Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *J Surg Res.* 2015 Mar;194(1):248–54.
52. Hynninen M, Pettilä V, Takkunen O, Orko R, Jansson S-E, Kuusela P, et al. Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock Augusta Ga.* 2003 Jul;20(1):1–4.



53. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999 Jul;27(7):1230–51.
54. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, et al. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 7;96(25):14541–6.
55. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock Augusta Ga.* 2014 Nov;42(5):383–91.
56. Coopersmith CM, Amiot DM, Stromberg PE, Dunne WM, Davis CG, Osborne DF, et al. Antibiotics improve survival and alter the inflammatory profile in a murine model of sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Shock Augusta Ga.* 2003 May;19(5):408–14.
57. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol.* 2000 Dec;1(6):496–501.
58. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1999 Apr 1;162(7):4148–56.
59. Hotchkiss RS, McConnell KW, Bullok K, Davis CG, Chang KC, Schwulst SJ, et al. TAT-BH4 and TAT-Bcl-xL peptides protect against sepsis-induced lymphocyte apoptosis in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006 May 1;176(9):5471–7.
60. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity.* 2014 Apr 17;40(4):463–75.
61. Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med.* 2015 Mar;277(3):277–93.
62. Shen X-F, Cao K, Jiang J-P, Guan W-X, Du J-F. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med.* 2017;21(9):1687–97.
63. Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med.* 2016;280(1):97–113.
64. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga.* 2016 Mar;45(3):259–70.
65. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio AR, Adembri C. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care Lond Engl.* 2015 Jan 28;19:26.
66. Ushiyama A, Kataoka H, Iijima T. Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiology. *J Intensive Care.* 2016;4(1):59.
67. Martin L, Koczera P, Zechendorf E, Schuerholz T. The Endothelial Glycocalyx: New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Sepsis. *BioMed Res Int.* 2016;2016:3758278.
68. Schnoor M, García Ponce A, Vadillo E, Pelayo R, Rossaint J, Zarbock A. Actin dynamics in the regulation of endothelial barrier functions and neutrophil recruitment during endotoxemia and sepsis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2017;74(11):1985–97.
69. London NR, Zhu W, Bozza FA, Smith MCP, Greif DM, Sorensen LK, et al. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med.* 2010 Mar 17;2(23):23ra19.
70. Levi M, van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb Res.* 2017 Jan;149:38–44.
71. Gragnano F, Sperlongano S, Golia E, Natale F, Bianchi R, Crisci M, et al. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:5620314.

72. Zecher D, Cumpelik A, Schifferli JA. Erythrocyte-derived microvesicles amplify systemic inflammation by thrombin-dependent activation of complement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Feb;34(2):313–20.
73. Shorr AF, Bernard GR, Dhainaut J-F, Russell JR, Macias WL, Nelson DR, et al. Protein C concentrations in severe sepsis: an early directional change in plasma levels predicts outcome. *Crit Care Lond Engl.* 2006;10(3):R92.
74. Matsumoto H, Yamakawa K, Ogura H, Koh T, Matsumoto N, Shimazu T. Enhanced expression of cell-specific surface antigens on endothelial microparticles in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Shock Augusta Ga.* 2015 May;43(5):443–9.
75. Madoiwa S. Recent advances in disseminated intravascular coagulation: endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC. *J Intensive Care.* 2015;3:8.
76. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003 May 15;101(10):3765–77.
77. Iba T, Levy JH. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost JTH.* 2018 Feb;16(2):231–41.
78. Levi M, Schultz M, van der Poll T. Sepsis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2013 Jul;39(5):559–66.
79. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann Intensive Care.* 2017 Dec 2;7(1):117.
80. Iba T, Levy JH, Wada H, Thachil J, Warkentin TE, Levi M, et al. Differential diagnoses for sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost JTH.* 2018 Dec 7;
81. Robba C, Crippa IA, Taccone FS. Septic Encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018 Oct 2;18(12):82.
82. Adam N, Kandelman S, Mantz J, Chrétien F, Sharshar T. Sepsis-induced brain dysfunction. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013 Feb;11(2):211–21.
83. Reiss LK, Schuppert A, Uhlig S. Inflammatory processes during acute respiratory distress syndrome: a complex system. *Curr Opin Crit Care.* 2018 Feb;24(1):1–9.
84. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 2012 Aug;122(8):2731–40.
85. Takasu O, Gaut JP, Swanson PE, Hotchkiss RS. Reply: The role of arrhythmias in defining cardiac dysfunction during sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Sep 15;188(6):751.
86. Zanotti-Cavazzoni SL, Hollenberg SM. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care.* 2009 Oct;15(5):392–7.
87. Sato R, Kuriyama A, Takada T, Nasu M, Luthe SK. Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore).* 2016 Sep;95(39):e5031.
88. Wang M, Markel TA, Meldrum DR. Interleukin 18 in the heart. *Shock Augusta Ga.* 2008 Jul;30(1):3–10.
89. Sergi C, Shen F, Lim DW, Liu W, Zhang M, Chiu B, et al. Cardiovascular dysfunction in sepsis at the dawn of emerging mediators. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2017 Nov;95:153–60.
90. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011 Jul;107(1):57–64.
91. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Sep;9(9):609–17.

92. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med.* 2017 Jun;43(6):816–28.
93. Post EH, Kellum JA, Bellomo R, Vincent J-L. Renal perfusion in sepsis: from macro- to microcirculation. *Kidney Int.* 2017;91(1):45–60.
94. Gómez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care.* 2016;22(6):546–53.
95. Lerolle N, Nochy D, Guérot E, Bruneval P, Fagon J-Y, Diehl J-L, et al. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med.* 2010 Mar;36(3):471–8.
96. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Mar 1;187(5):509–17.
97. Aslan A, van den Heuvel MC, Stegeman CA, Popa ER, Leliveld AM, Molema G, et al. Kidney histopathology in lethal human sepsis. *Crit Care Lond Engl.* 2018 27;22(1):359.
98. Maiden MJ, Otto S, Brealey JK, Finnis ME, Chapman MJ, Kuchel TR, et al. Structure and Function of the Kidney in Septic Shock. A Prospective Controlled Experimental Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 15;194(6):692–700.
99. Okamoto K, Tamura T, Sawatsubashi Y. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care.* 2016;4:23.
100. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. Coagulopathy of Acute Sepsis. *Semin Thromb Hemost.* 2015 Sep;41(6):650–8.
101. Bauer M, Press AT, Trauner M. The liver in sepsis: patterns of response and injury. *Curr Opin Crit Care.* 2013 Apr;19(2):123–7.
102. O’Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, et al. Summary of recommendations: Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-related Infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2011 May;52(9):1087–99.
103. van Engelen TSR, Wiersinga WJ, Scicluna BP, van der Poll T. Biomarkers in Sepsis. *Crit Care Clin.* 2018 Jan;34(1):139–52.
104. Jensen J-U, Bouadma L. Why biomarkers failed in sepsis. *Intensive Care Med.* 2016 Dec;42(12):2049–51.
105. Rowland T, Hilliard H, Barlow G. Procalcitonin: potential role in diagnosis and management of sepsis. *Adv Clin Chem.* 2015;68:71–86.
106. de Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis.* 2016 Jul;16(7):819–27.
107. Westwood M, Ramaekers B, Whiting P, Tomini F, Joore M, Armstrong N, et al. Procalcitonin testing to guide antibiotic therapy for the treatment of sepsis in intensive care settings and for suspected bacterial infection in emergency department settings: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess Winch Engl.* 2015 Nov;19(96):v–xxv, 1–236.
108. Schuetz P, Wirz Y, Sager R, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 12;10:CD007498.
109. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006 Jun;34(6):1589–96.
110. Laupland KB, Ferrer R. Is it time to implement door-to-needle time for “infection attacks”? *Intensive Care Med.* 2017;43(11):1712–3.

111. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*. 2009 Nov;136(5):1237–48.
112. Zahar J-R, Timsit J-F, Garrouste-Orgeas M, Français A, Vesin A, Vesim A, et al. Outcomes in severe sepsis and patients with septic shock: pathogen species and infection sites are not associated with mortality. *Crit Care Med*. 2011 Aug;39(8):1886–95.
113. Timsit J-F, Paiva J-A, Bassetti M. Focus on optimization of early antimicrobial therapy in ICU-acquired infections. *Intensive Care Med*. 2016 Nov;42(11):1658–60.
114. Kumar A, Zarychanski R, Light B, Parrillo J, Maki D, Simon D, et al. Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: a propensity-matched analysis. *Crit Care Med*. 2010 Sep;38(9):1773–85.
115. Micek ST, Welch EC, Khan J, Pervez M, Doherty JA, Reichley RM, et al. Empiric combination antibiotic therapy is associated with improved outcome against sepsis due to Gram-negative bacteria: a retrospective analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May;54(5):1742–8.
116. Tabah A, Cotta MO, Garnacho-Montero J, Schouten J, Roberts JA, Lipman J, et al. A Systematic Review of the Definitions, Determinants, and Clinical Outcomes of Antimicrobial De-escalation in the Intensive Care Unit. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016 Apr 15;62(8):1009–17.
117. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009 Dec 2;302(21):2323–9.
118. Heenen S, Jacobs F, Vincent J-L. Antibiotic strategies in severe nosocomial sepsis: why do we not de-escalate more often? *Crit Care Med*. 2012 May;40(5):1404–9.
119. Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med*. 2009 Mar;37(3):840–51; quiz 859.
120. Sime FB, Roberts MS, Roberts JA. Optimization of dosing regimens and dosing in special populations. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Oct;21(10):886–93.
121. Elyer RF, Mueller BA, Medscape. Antibiotic dosing in critically ill patients with acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011 Apr;7(4):226–35.
122. Vincent J-L, De Backer D. Circulatory shock. *N Engl J Med*. 2014 06;370(6):583.
123. Vincent J-L, Taccone FS. Microvascular monitoring - Do “global” markers help? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2016 Dec;30(4):399–405.
124. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1368–77.
125. ProCESS Investigators, Yealy DM, Kellum JA, Huang DT, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. A randomized trial of protocol-based care for early septic shock. *N Engl J Med*. 2014 May 1;370(18):1683–93.
126. ARISE Investigators, ANZICS Clinical Trials Group, Peake SL, Delaney A, Bailey M, Bellomo R, et al. Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. *N Engl J Med*. 2014 Oct 16;371(16):1496–506.
127. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017 Mar;43(3):304–77.

128. Reinhart K, Perner A, Sprung CL, Jaeschke R, Schortgen F, Johan Groeneveld AB, et al. Consensus statement of the ESICM task force on colloid volume therapy in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2012 Mar;38(3):368–83.
129. Myburgh JA. Fluid resuscitation in acute medicine: what is the current situation? *J Intern Med.* 2015 Jan;277(1):58–68.
130. De Backer D, Aldecoa C, Njimi H, Vincent J-L. Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: a meta-analysis\*. *Crit Care Med.* 2012 Mar;40(3):725–30.
131. De Backer D, Biston P, Devriendt J, Madl C, Chochrad D, Aldecoa C, et al. Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N Engl J Med.* 2010 Mar 4;362(9):779–89.
132. Jones AE, Shapiro NI, Trzeciak S, Arnold RC, Claremont HA, Kline JA, et al. Lactate clearance vs central venous oxygen saturation as goals of early sepsis therapy: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2010 Feb 24;303(8):739–46.
133. Vieillard-Baron A, Matthay M, Teboul JL, Bein T, Schultz M, Magder S, et al. Experts' opinion on management of hemodynamics in ARDS patients: focus on the effects of mechanical ventilation. *Intensive Care Med.* 2016 May;42(5):739–49.
134. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med.* 1999 Jan 21;340(3):207–14.
135. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med.* 2014 Apr;20(4):195–203.
136. Marshall JC. Clinical trials of mediator-directed therapy in sepsis: what have we learned? *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S75-83.
137. Alejandria MM, Lansang MAD, Dans LF, Mantaring JB. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis, severe sepsis and septic shock. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Sep 16;(9):CD001090.
138. Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 1996 Jun 27;334(26):1697–702.
139. Qiu P, Cui X, Barochia A, Li Y, Natanson C, Eichacker PQ. The evolving experience with therapeutic TNF inhibition in sepsis: considering the potential influence of risk of death. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011 Nov;20(11):1555–64.
140. Lehman KD, Thiessen K. Sepsis guidelines: Clinical practice implications. *Nurse Pract.* 2015 Jun 11;40(6):1–6.
141. Cross G, Bilgrami I, Eastwood G, Johnson P, Howden BP, Bellomo R, et al. The epidemiology of sepsis during rapid response team reviews in a teaching hospital. *Anaesth Intensive Care.* 2015 Mar;43(2):193–8.
142. Dowdy DW, Eid MP, Sedrakyan A, Mendez-Tellez PA, Pronovost PJ, Herridge MS, et al. Quality of life in adult survivors of critical illness: a systematic review of the literature. *Intensive Care Med.* 2005 May;31(5):611–20.
143. Prescott HC, Langa KM, Liu V, Escobar GJ, Iwashyna TJ. Increased 1-year healthcare use in survivors of severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Jul 1;190(1):62–9.
144. Nelson JE, Meier DE, Litke A, Natale DA, Siegel RE, Morrison RS. The symptom burden of chronic critical illness. *Crit Care Med.* 2004 Jul;32(7):1527–34.
145. Baldwin MR. Measuring and predicting long-term outcomes in older survivors of critical illness. *Minerva Anesthesiol.* 2015 Jun;81(6):650–61.
146. Kaarlola A, Tallgren M, Pettilä V. Long-term survival, quality of life, and quality-adjusted life-years among critically ill elderly patients. *Crit Care Med.* 2006 Aug;34(8):2120–6.

147. Battle CE, Davies G, Evans PA. Long term health-related quality of life in survivors of sepsis in South West Wales: an epidemiological study. *PloS One*. 2014;9(12):e116304.
148. Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Jan;84(1):62–9.
149. Parker AM, Sricharoenchai T, Raparla S, Schneck KW, Bienvenu OJ, Needham DM. Posttraumatic stress disorder in critical illness survivors: a metaanalysis. *Crit Care Med*. 2015 May;43(5):1121–9.
150. Hofhuis JGM, Spronk PE, van Stel HF, Schrijvers GJP, Rommes JH, Bakker J. The impact of critical illness on perceived health-related quality of life during ICU treatment, hospital stay, and after hospital discharge: a long-term follow-up study. *Chest*. 2008 Feb;133(2):377–85.
151. Poulsen JB, Møller K, Kehlet H, Perner A. Long-term physical outcome in patients with septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009 Jul;53(6):724–30.
152. Peters van Ton AM, Kox M, Abdo WF, Pickkers P. Precision Immunotherapy for Sepsis. *Front Immunol*. 2018;9:1926.
153. Blum CA, Nigro N, Briel M, Schuetz P, Ullmer E, Suter-Widmer I, et al. Adjunct prednisone therapy for patients with community-acquired pneumonia: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2015 Apr 18;385(9977):1511–8.
154. Torres A, Sibila O, Ferrer M, Polverino E, Menendez R, Mensa J, et al. Effect of corticosteroids on treatment failure among hospitalized patients with severe community-acquired pneumonia and high inflammatory response: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015 Feb 17;313(7):677–86.
155. Kang JH, Super M, Yung CW, Cooper RM, Domansky K, Graveline AR, et al. An extracorporeal blood-cleansing device for sepsis therapy. *Nat Med*. 2014 Oct;20(10):1211–6.
156. Patil NK, Bohannon JK, Sherwood ER. Immunotherapy: A promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Pharmacol Res*. 2016;111:688–702.
157. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest*. 2016 Jan;126(1):23–31.
158. Rimmelé T, Payen D, Cantaluppi V, Marshall J, Gomez H, Gomez A, et al. IMMUNE CELL PHENOTYPE AND FUNCTION IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga*. 2016 Mar;45(3):282–91.
159. Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol*. 2013 Aug;25(4):477–83.
160. Chéron A, Monneret G, Landelle C, Floccard B, Allaouchiche B. [Low monocytic HLA-DR expression and risk of secondary infection]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2010 May;29(5):368–76.
161. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Oct 1;180(7):640–8.
162. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol*. 2011 May;11(5):330–42.
163. Hotchkiss RS, Moldawer LL. Parallels between cancer and infectious disease. *N Engl J Med*. 2014 Jul 24;371(4):380–3.

164. Sharma NK, Salomao R. Sepsis Through the Eyes of Proteomics: The Progress in the Last Decade. *Shock* Augusta Ga. 2017;47(1S Suppl 1):17–25.
165. Maslove DM, Wong HR. Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations. *Trends Mol Med*. 2014 Apr;20(4):204–13.
166. Sweeney TE, Shidham A, Wong HR, Khatri P. A comprehensive time-course-based multicohort analysis of sepsis and sterile inflammation reveals a robust diagnostic gene set. *Sci Transl Med*. 2015 May 13;7(287):287ra71.
167. Davenport EE, Burnham KL, Radhakrishnan J, Humburg P, Hutton P, Mills TC, et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2016;4(4):259–71.
168. Chung LP, Waterer GW. Genetic predisposition to respiratory infection and sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011 Dec;48(5–6):250–68.
169. Assmann G, Highet RJ, Sokoloski EA, Brewer HB. <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy of native and recombined lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Sep;71(9):3701–5.
170. Cockerill GW, Reed S. High-density lipoprotein: multipotent effects on cells of the vasculature. *Int Rev Cytol*. 1999;188:257–97.
171. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011 Oct;17(10):594–603.
172. Delalla OF, Elliott HA, Gofman JW. Ultracentrifugal studies of high density serum lipoproteins in clinically healthy adults. *Am J Physiol*. 1954 Nov;179(2):333–7.
173. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*. 1986;128:417–31.
174. Asztalos BF, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *Am J Cardiol*. 2003 Apr 3;91(7A):12E–17E.
175. Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am J Cardiol*. 2002 Jul 15;90(2):89–94.
176. Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005 Feb;5(2):551–65.
177. Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005 Apr;5(5):1431–45.
178. Davidson WS, Silva RAGD, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jun;29(6):870–6.
179. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):746–56.
180. Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):611–6.
181. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A: HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002, 161(1):1–16.

182. Miller NE, Thelle DS, Forde OH, Mjos OD. The Tromsø heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. *Lancet Lond Engl.* 1977 May 7;1(8019):965–8.
183. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977 May;62(5):707–14.
184. Rosenson RS, Brewer HB, Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2016 Jan;13(1):48–60.
185. Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20;275(42):33053–8.
186. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis.* 1999 Aug;145(2):227–38.
187. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972 Feb 25;46(4):1493–8.
188. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med Berl Ger.* 2006 Apr;84(4):276–94.
189. Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Feb 1;23(2):160–7.
190. Jahangiri A, Rader DJ, Marchadier D, Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye K-A. Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 2005 May;46(5):896–903.
191. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, et al. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):656–61.
192. Martinez LO, Jacquet S, Esteve J-P, Rolland C, Cabezón E, Champagne E, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature.* 2003 Jan 2;421(6918):75–9.
193. Brundert M, Heeren J, Merkel M, Carambia A, Herkel J, Groitl P, et al. Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J Lipid Res.* 2011 Apr;52(4):745–58.
194. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001;7(3):167–202.
195. Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest.* 1990 Sep;86(3):696–702.
196. Eggesbø JB, Lyberg T, Aspelin T, Hjermann I, Kierulf P. Different binding of 125I-LPS to plasma proteins from persons with high or low HDL. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996 Oct;56(6):533–43.
197. Roth RI, Levin FC, Levin J. Distribution of bacterial endotoxin in human and rabbit blood and effects of stroma-free hemoglobin. *Infect Immun.* 1993 Aug;61(8):3209–15.
198. Ulevitch RJ, Johnston AR. The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum. *J Clin Invest.* 1978 Dec;62(6):1313–24.
199. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest.* 1988 Jun;81(6):1925–37.



200. Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest.* 1979 Nov;64(5):1516–24.
201. Rall DP, Gaskins JR, Kelly MG. Reduction of febrile response to bacterial polysaccharide following incubation with serum. *Am J Physiol.* 1957 Mar;188(3):559–62.
202. Parker TS, Levine DM, Chang JC, Laxer J, Coffin CC, Rubin AL. Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect Immun.* 1995 Jan;63(1):253–8.
203. Levels JHM, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJH. Distribution and Kinetics of Lipoprotein-Bound Endotoxin. *Infect Immun.* 2001 May;69(5):2821–8.
204. Kitchens RL, Thompson PA, Munford RS, O’Keefe GE. Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid levels and enhance lipopolysaccharide binding to plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 2003 Dec;44(12):2339–48.
205. Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 15;90(24):12040–4.
206. Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, Reuter D, Pfeil D, Seilhamer JJ, et al. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics.* 1997 Dec 15;46(3):416–25.
207. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med.* 1986 Sep 1;164(3):777–93.
208. Vesny CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS: Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun* 2000, 68(5):2410-2417.
209. Lamping N, Dettmer R, Schröder NW, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R, et al. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest.* 1998 May 15;101(10):2065–71.
210. Van Lenten BJ, Fogelman AM, Haberland ME, Edwards PA. The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Apr;83(8):2704–8.
211. Brandenburg K, Jürgens G, Andrä J, Lindner B, Koch MHJ, Blume A, et al. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur J Biochem.* 2002 Dec;269(23):5972–81.
212. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 1994, 180(3):1025-1035.
213. Morath S, von Aulock S, Hartung T. Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *J Endotoxin Res.* 2005;11(6):348–56.
214. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2003 Dec;67(4):686–723.
215. Grunfeld C, Marshall M, Shigenaga JK, Moser AH, Tobias P, Feingold KR. Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipoteichoic acid. *J Lipid Res.* 1999 Feb;40(2):245–52.
216. Angus DC, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013, 369(9):840-851.

217. Parent C, Eichacker PQ. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infect Dis Clin North Am.* 1999 Jun;13(2):427–47, x.
218. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S302-312.
219. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Nov;15(11):1987–94.
220. Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE, et al. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation.* 2001 Jan 2;103(1):108–12.
221. McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, Cuzzocrea S, Mota-Filipe H, Hinds CJ, Miller NE, Thiernemann C: Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock* 2003, 20(6):551-557.
222. Park S-H, Park JHY, Kang J-S, Kang Y-H. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Feb;35(2):168–82.
223. Suzuki M, Pritchard DK, Becker L, Hoofnagle AN, Tanimura N, Bammler TK, et al. High-density lipoprotein suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. *Circulation.* 2010 Nov 9;122(19):1919–27.
224. Mineo C, Shaul PW. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. *Circ Res.* 2012 Sep 28;111(8):1079–90.
225. De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt SV, Beyer M, et al. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol.* 2014 Feb;15(2):152–60.
226. Zhu S, Wang Y, Chen W, Li W, Wang A, Wong S, et al. High-Density Lipoprotein (HDL) Counter-Regulates Serum Amyloid A (SAA)-Induced sPLA2-IIe and sPLA2-V Expression in Macrophages. *PloS One.* 2016;11(11):e0167468.
227. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015 Oct;129(2):83–94.
228. Liadaki KN, Liu T, Xu S, Ishida BY, Duchateaux PN, Krieger JP, et al. Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem.* 2000 Jul 14;275(28):21262–71.
229. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Nègre-Salvayre A, de Souza JA, et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1843–9.
230. Imachi H, Murao K, Cao W, Tada S, Taminato T, Wong NCW, et al. Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 May 1;23(5):898–904.
231. van der Stoep M, Korporaal SJA, Van Eck M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. *Cardiovasc Res.* 2014 Aug 1;103(3):362–71.
232. Viswambharan H, Ming X-F, Zhu S, Hubsch A, Lerch P, Vergères G, et al. Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-

- kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2004 Apr 16;94(7):918–25.
233. Riwanto M, Landmesser U. High density lipoproteins and endothelial functions: mechanistic insights and alterations in cardiovascular disease. *J Lipid Res.* 2013 Dec;54(12):3227–43.
234. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med.* 2004 Dec 15;37(12):1986–94.
235. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol.* 2000 Aug;11(4):383–8.
236. Tward A, Xia Y-R, Wang X-P, Shi Y-S, Park C, Castellani LW, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002 Jul 23;106(4):484–90.
237. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998 Apr 15;101(8):1581–90.
238. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):2882–91.
239. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation.* 2000 May 30;101(21):2510–7.
240. Yan J-J, Jung J-S, Lee J-E, Lee J, Huh S-O, Kim H-S, et al. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med.* 2004 Feb;10(2):161–7.
241. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998 Jul 16;394(6690):284–7.
242. Christison JK, Rye KA, Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1995 Sep;36(9):2017–26.
243. Koprassch S, Pietzsch J, Graessler J. The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL. *Mol Cell Biochem.* 2004 Mar;258(1–2):121–7.
244. Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):2158–66.
245. Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jun 16;272(3):872–6.
246. Muller C, Salvayre R, Nègre-Salvayre A, Vindis C. HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death Differ.* 2011 May;18(5):817–28.
247. de Souza JA, Vindis C, Nègre-Salvayre A, Rye K-A, Couturier M, Therond P, et al. Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med.* 2010 Mar;14(3):608–20.

248. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34480–5.
249. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, et al. Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia. *Crit Care Med*. 1996 Apr;24(4):584–9.
250. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, et al. Relationship of hypolipidemia to cytokine concentrations and outcomes in critically ill surgical patients. *Crit Care Med*. 2001 Aug;29(8):1563–8.
251. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP: Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Critical care medicine* 2003, 31(5):1359-1366.
252. Barlage S, Gnewuch C, Liebisch G, Wolf Z, Audebert FX, Gluck T, Frohlich D, Kramer BK, Rothe G, Schmitz G: Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med* 2009, 35(11):1877-1885.
253. Shor R, Wainstein J, Oz D, Boaz M, Matas Z, Fux A, et al. Low HDL levels and the risk of death, sepsis and malignancy. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc*. 2008 Apr;97(4):227–33.
254. Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, Yang PC: Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Critical care medicine* 2005, 33(8):1688-1693.
255. Cirstea M, Walley KR, Russell JA, Brunham LR, Genga KR, Boyd JH. Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an early prognostic marker for organ dysfunction and death in patients with suspected sepsis. *J Crit Care*. 2017;38:289–94.
256. Tanaka S, Labreuche J, Drumez E, Harrois A, Hamada S, Vigué B, et al. Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit. *Ann Intensive Care*. 2017 Dec;7(1):60.
257. Lee SH, Park MS, Park BH, Jung WJ, Lee IS, Kim SY, Kim EY, Jung JY, Kang YA, Kim YS et al: Prognostic Implications of Serum Lipid Metabolism over Time during Sepsis. *Biomed Res Int* 2015, 2015:789298.
258. Lekkou A, Mouzaki A, Siagris D, Ravani I, Gogos CA. Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis. *J Crit Care*. 2014 Oct;29(5):723–7.
259. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in infectious diseases and sepsis. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:483–508.
260. Trinder M, Genga KR, Kong HJ, Blauw LL, Lo C, Li X, et al. Cholesteryl Ester Transfer Protein Influences High-Density Lipoprotein Levels and Survival in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Oct 15;
261. Vermont CL, den Brinker M, Kâkeci N, de Kleijn ED, de Rijke YB, Joosten KFM, et al. Serum lipids and disease severity in children with severe meningococcal sepsis. *Crit Care Med*. 2005 Jul;33(7):1610–5.
262. Tsai M-H, Peng Y-S, Chen Y-C, Lien J-M, Tian Y-C, Fang J-T, et al. Low serum concentration of apolipoprotein A-I is an indicator of poor prognosis in cirrhotic patients with severe sepsis. *J Hepatol*. 2009 May;50(5):906–15.
263. Roveran Genga K, Lo C, Cirstea M, Zhou G, Walley KR, Russell JA, et al. Two-year follow-up of patients with septic shock presenting with low HDL: the effect upon acute kidney injury, death and estimated glomerular filtration rate. *J Intern Med*. 2017 May;281(5):518–29.

264. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care Lond Engl*. 2010;14(1):R15.
265. Khovidhunkit W, Kim M-S, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res*. 2004 Jul;45(7):1169–96.
266. Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis*. 2000 Jun;181 Suppl 3:S462-472.
267. Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkilä E, Taskinen MR. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism*. 1988 Sep;37(9):859–65.
268. de la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, Byrne M, Joshi MR, Nguyen V, et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis*. 2012 Jun;222(2):390–4.
269. van der Westhuyzen DR, de Beer FC, Webb NR. HDL cholesterol transport during inflammation. *Curr Opin Lipidol*. 2007 Apr;18(2):147–51.
270. Jahangiri A, de Beer MC, Noffsinger V, Tannock LR, Ramaiah C, Webb NR, et al. HDL remodeling during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Feb;29(2):261–7.
271. Hacquebard M, Ducart A, Schmartz D, Malaisse WJ, Carpentier YA. Changes in plasma LDL and HDL composition in patients undergoing cardiac surgery. *Lipids*. 2007 Dec;42(12):1143–53.
272. Novak F, Vavrova L, Kodydkova J, Novak F, Hynkova M, Zak A, et al. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin Exp Med*. 2010 Mar;10(1):21–5.
273. Kotosai M, Shimada S, Kanda M, Matsuda N, Sekido K, Shimizu Y, et al. Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids*. 2013 Jun;48(6):569–78.
274. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest*. 1995 Dec;96(6):2758–67.
275. Vaisar T, Tang C, Babenko I, Hutchins P, Wimberger J, Suffredini AF, et al. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res*. 2015 Aug;56(8):1519–30.
276. Sharma NK, Tashima AK, Brunialti MKC, Ferreira ER, Torquato RJS, Mortara RA, et al. Proteomic study revealed cellular assembly and lipid metabolism dysregulation in sepsis secondary to community-acquired pneumonia. *Sci Rep*. 2017 Nov 15;7(1):15606.
277. Sharma NK, Ferreira BL, Tashima AK, Brunialti MKC, Torquato RJS, Bafi A, et al. Lipid metabolism impairment in patients with sepsis secondary to hospital acquired pneumonia, a proteomic analysis. *Clin Proteomics*. 2019;16:29.
278. McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, et al. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2009 Mar 3;119(8):1135–45.
279. Malik P, Berisha SZ, Santore J, Agatista-Boyle C, Brubaker G, Smith JD. Zymosan-mediated inflammation impairs in vivo reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 2011 May;52(5):951–7.
280. Smoak KA, Aloor JJ, Madenspacher J, Merrick BA, Collins JB, Zhu X, et al. Myeloid differentiation primary response protein 88 couples reverse cholesterol transport to inflammation. *Cell Metab*. 2010 Jun 9;11(6):493–502.

281. Guirgis FW, Leeuwenburgh C, Grijalva V, Bowman J, Kalynych C, Moldawer L, et al. HDL Cholesterol Efflux is Impaired in Older Patients with Early Sepsis: A Subanalysis of a Prospective Pilot Study. *Shock* Augusta Ga. 2017 Oct 18;
282. Guirgis FW, Dodani S, Moldawer L, Leeuwenburgh C, Bowman J, Kalynych C, et al. Exploring the Predictive Ability of Dysfunctional High-Density Lipoprotein for Adverse Outcomes in Emergency Department Patients with Sepsis: A Preliminary Investigation. *Shock* Augusta Ga. 2017 Nov;48(5):539–44.
283. Ossoli A, Pavanello C, Giorgio E, Calabresi L, Gomaraschi M. Dysfunctional HDL as a therapeutic target for atherosclerosis prevention. *Curr Med Chem*. 2018 Mar 15;
284. Carnuta MG, Stancu CS, Toma L, Sanda GM, Niculescu LS, Deleanu M, et al. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Sci Rep*. 2017 Aug 4;7(1):7295.
285. Ortiz-Munoz G, Couret D, Lapergue B, Bruckert E, Meseguer E, Amarenco P, et al. Dysfunctional HDL in acute stroke. *Atherosclerosis*. 2016 Oct;253:75–80.
286. Zimetti F, De Vuono S, Gomaraschi M, Adorni MP, Favari E, Ronda N, et al. Plasma cholesterol homeostasis, HDL remodeling and function during the acute phase reaction. *J Lipid Res*. 2017 Oct;58(10):2051–60.
287. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Després J-P, Hovingh GK, Stroes ESG, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med*. 2009 Jan 20;150(2):84–93.
288. Mutharasan RK, Thaxton CS, Berry J, Daviglius ML, Yuan C, Sun J, et al. HDL efflux capacity, HDL particle size, and high-risk carotid atherosclerosis in a cohort of asymptomatic older adults: the Chicago Healthy Aging Study. *J Lipid Res*. 2017 Mar;58(3):600–6.
289. Ditah C, Otvos J, Nassar H, Shaham D, Sinnreich R, Kark JD. Small and medium sized HDL particles are protectively associated with coronary calcification in a cross-sectional population-based sample. *Atherosclerosis*. 2016 Aug;251:124–31.
290. Morin EE, Guo L, Schwendeman A, Li X-A. HDL in sepsis - risk factor and therapeutic approach. *Front Pharmacol*. 2015;6:244.
291. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1325–31.
292. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol*. 2011 Apr;8(4):222–32.
293. Datta G, Garber DW, Chung BH, Chaddha M, Dashti N, Bradley WA, et al. Cationic domain 141-150 of apoE covalently linked to a class A amphipathic helix enhances atherogenic lipoprotein metabolism in vitro and in vivo. *J Lipid Res*. 2001 Jun;42(6):959–66.
294. Zhang Z, Datta G, Zhang Y, Miller AP, Mochon P, Chen Y-F, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide treatment inhibits inflammatory responses and improves survival in septic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Aug;297(2):H866-873.
295. Dai L, Datta G, Zhang Z, Gupta H, Patel R, Honavar J, et al. The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J Lipid Res*. 2010 Sep;51(9):2695–705.
296. Gupta H, Dai L, Datta G, Garber DW, Grenett H, Li Y, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by an apolipoprotein AI mimetic peptide. *Circ Res*. 2005 Aug 5;97(3):236–43.

297. Datta G, Gupta H, Zhang Z, Mayakonda P, Anantharamaiah GM, White CR. HDL Mimetic Peptide Administration Improves Left Ventricular Filling and Cardiac output in Lipopolysaccharide-Treated Rats. *J Clin Exp Cardiol*. 2011 Dec 22;2(172).
298. Kwon WY, Suh GJ, Kim KS, Kwak YH, Kim K. 4F, apolipoprotein AI mimetic peptide, attenuates acute lung injury and improves survival in endotoxemic rats. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012 Jun;72(6):1576–83.
299. Moreira RS, Irigoyen M, Sanches TR, Volpini RA, Camara NOS, Malheiros DM, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F attenuates kidney injury, heart injury, and endothelial dysfunction in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Sep 1;307(5):R514–524.
300. Casas AT, Hubsch AP, Doran JE. Effects of reconstituted high-density lipoprotein in persistent gram-negative bacteremia. *Am Surg*. 1996 May;62(5):350–5.
301. Zhang X, Wang L, Chen B. Recombinant HDL (Milano) protects endotoxin-challenged rats from multiple organ injury and dysfunction. *Biol Chem*. 2015 Jan;396(1):53–60.
302. Lerch PG, Förtsch V, Hodler G, Bolli R. Production and characterization of a reconstituted high density lipoprotein for therapeutic applications. *Vox Sang*. 1996;71(3):155–64.
303. Patel S, Drew BG, Nakhla S, Duffy SJ, Murphy AJ, Barter PJ, et al. Reconstituted high-density lipoprotein increases plasma high-density lipoprotein anti-inflammatory properties and cholesterol efflux capacity in patients with type 2 diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Mar 17;53(11):962–71.
304. Tardif J-C, Grégoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Lespérance J, Heinson TM, et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007 Apr 18;297(15):1675–82.
305. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Hudgins LC, Sloan B-J, et al. Safety and pharmacokinetics of an endotoxin-binding phospholipid emulsion. *Ann Pharmacother*. 2003 Aug;37(7–8):943–50.
306. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Feuerbach F, Saal SD, Sloan B-J, et al. Neutralization of endotoxin by a phospholipid emulsion in healthy volunteers. *J Infect Dis*. 2005 May 1;191(9):1515–22.
307. Dellinger RP, Tomayko JF, Angus DC, Opal S, Cupo MA, McDermott S, et al. Efficacy and safety of a phospholipid emulsion (GR270773) in Gram-negative severe sepsis: results of a phase II multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-finding clinical trial. *Crit Care Med*. 2009 Nov;37(11):2929–38.
308. Winchell WW, Hardy J, Levine DM, Parker TS, Gordon BR, Saal SD. Effect of administration of a phospholipid emulsion on the initial response of horses administered endotoxin. *Am J Vet Res*. 2002 Oct;63(10):1370–8.
309. Goldfarb RD, Parker TS, Levine DM, Glock D, Akhter I, Alkhudari A, et al. Protein-free phospholipid emulsion treatment improved cardiopulmonary function and survival in porcine sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Feb;284(2):R550–557.
310. Pajkrt D, Doran JE, Koster F, Lerch PG, Arnet B, van der Poll T, et al. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):1601–8.
311. Pajkrt D, Lerch PG, van der Poll T, Levi M, Illi M, Doran JE, et al. Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thromb Haemost*. 1997 Feb;77(2):303–7.
312. Hazeldine J, Hampson P, Lord JM: The impact of trauma on neutrophil function. *Injury* 2014, 45(12):1824–1833.

313. Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ, Koenderman L, Kubek P, Lilford RJ: The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet* 2014, 384(9952):1455-1465.
314. Pugin J: How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care* 2012, 2(1):27.
315. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG: Systemic inflammation after trauma. *Injury* 2007, 38(12):1336-1345.
316. Binkowska AM, Michalak G, Slotwinski R: Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Cent Eur J Immunol* 2015, 40(2):206-216.
317. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, et al. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol*. 2013 Jun;169(3):493-511.
318. Heitmann BL. The effects of gender and age on associations between blood lipid levels and obesity in Danish men and women aged 35-65 years. *J Clin Epidemiol*. 1992 Jul;45(7):693-702.
319. Heiss G, Tamir I, Davis CE, Tyroler HA, Rifkind BM, Schonfeld G, et al. Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study. *Circulation*. 1980 Feb;61(2):302-15.
320. Abbott RD, Garrison RJ, Wilson PW, Epstein FH, Castelli WP, Feinleib M, et al. Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes. The Framingham study. *Arterioscler Dallas Tex*. 1983 Jun;3(3):260-72.
321. Wilson PW, Anderson KM, Harris T, Kannel WB, Castelli WP. Determinants of change in total cholesterol and HDL-C with age: the Framingham Study. *J Gerontol*. 1994 Nov;49(6):M252-257.
322. Gao F, Ren Y-J, Shen X-Y, Bian Y-F, Xiao C-S, Li H. Correlation between the High Density Lipoprotein and its Subtypes in Coronary Heart Disease. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2016;38(5):1906-14.
323. Li J-J, Zhang Y, Li S, Cui C-J, Zhu C-G, Guo Y-L, et al. Large HDL Subfraction But Not HDL-C Is Closely Linked With Risk Factors, Coronary Severity and Outcomes in a Cohort of Nontreated Patients With Stable Coronary Artery Disease: A Prospective Observational Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Jan;95(4):e2600.
324. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APHA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Nov 8;
325. Delbosc S, Alsac J-M, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, et al. *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PloS One*. 2011 Apr 13;6(4):e18679.
326. Gao F, Ren Y-J, Shen X-Y, Bian Y-F, Xiao C-S, Li H. Correlation between the High Density Lipoprotein and its Subtypes in Coronary Heart Disease. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2016;38(5):1906-14.
327. Cirstea M, Walley KR, Russell JA, Brunham LR, Genga KR, Boyd JH. Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an early prognostic marker for organ dysfunction and death in patients with suspected sepsis. *J Crit Care*. 2017 Apr;38:289-94.
328. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017 Mar;43(3):304-77.



329. Guirgis FW, Dodani S, Moldawer L, Leeuwenburgh C, Bowman J, Kalynych C, et al. Exploring the Predictive Ability of Dysfunctional High-Density Lipoprotein for Adverse Outcomes in Emergency Department Patients with Sepsis: A Preliminary Investigation. *Shock* Augusta Ga. 2017 Nov;48(5):539–44.
330. Siri-Tarino PW, Krauss RM. The early years of lipoprotein research: from discovery to clinical application. *J Lipid Res*. 2016 Oct;57(10):1771–7.
331. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*. 2005 Oct 13;437(7061):1032–7.
332. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011 Dec 19;208(13):2581–90.
333. Tang BM, Huang SJ, McLean AS. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit Care Lond Engl*. 2010;14(6):R237.
334. Cao Z, Robinson RAS. The role of proteomics in understanding biological mechanisms of sepsis. *Proteomics Clin Appl*. 2014 Feb;8(1–2):35–52.
335. Sharma NK, Salomao R. Sepsis Through the Eyes of Proteomics: The Progress in the Last Decade. *Shock* Augusta Ga. 2017;47(1S Suppl 1):17–25.
336. Morrisett JD, Jackson RL, Gotto AM. Lipoproteins: structure and function. *Annu Rev Biochem*. 1975;44:183–207.
337. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984 Dec 1;25(12):1277–94.
338. Kumaraswamy SB, Linder A, Åkesson P, Dahlbäck B. Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care Lond Engl*. 2012 Dec 12;16(2):R60.
339. Utermann G. The mysteries of lipoprotein(a). *Science*. 1989 Nov 17;246(4932):904–10.
340. Scanu AM. Lipoprotein(a). A genetic risk factor for premature coronary heart disease. *JAMA*. 1992 Jun 24;267(24):3326–9.
341. Bostom AG, Cupples LA, Jenner JL, Ordovas JM, Seman LJ, Wilson PW, et al. Elevated plasma lipoprotein(a) and coronary heart disease in men aged 55 years and younger. A prospective study. *JAMA*. 1996 Aug 21;276(7):544–8.
342. Mooser V, Berger MM, Tappy L, Cayeux C, Marcovina SM, Darioli R, et al. Major reduction in plasma Lp(a) levels during sepsis and burns. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Apr;20(4):1137–42.
343. McNutt MC, Kwon HJ, Chen C, Chen JR, Horton JD, Lagace TA. Antagonism of secreted PCSK9 increases low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2009 Apr 17;284(16):10561–70.
344. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2007 Feb;32(2):71–7.
345. Walley KR, Thain KR, Russell JA, Reilly MP, Meyer NJ, Ferguson JF, et al. PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome. *Sci Transl Med*. 2014 Oct 15;6(258):258ra143.
346. Ricci C, Ruscica M, Camera M, Rossetti L, Macchi C, Colciago A, et al. PCSK9 induces a pro-inflammatory response in macrophages. *Sci Rep*. 2018 02;8(1):2267.
347. Boyd JH, Fjell CD, Russell JA, Sirounis D, Cirstea MS, Walley KR. Increased Plasma PCSK9 Levels Are Associated with Reduced Endotoxin Clearance and the Development of Acute Organ Failures during Sepsis. *J Innate Immun*. 2016;8(2):211–20.

348. Rannikko J, Jacome Sanz D, Ortutay Z, Seiskari T, Aittoniemi J, Huttunen R, et al. Reduced plasma PCSK9 response in patients with bacteraemia is associated with mortality. *J Intern Med*. 2019 Jun 5;
349. Grin PM, Dwivedi DJ, Chathely KM, Trigatti BL, Prat A, Seidah NG, et al. Low-density lipoprotein (LDL)-dependent uptake of Gram-positive lipoteichoic acid and Gram-negative lipopolysaccharide occurs through LDL receptor. *Sci Rep*. 2018 Jul 12;8(1):10496.
350. Le Bras M, Roquilly A, Deckert V, Langhi C, Feuillet F, Sébille V, et al. Plasma PCSK9 is a late biomarker of severity in patients with severe trauma injury. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;98(4):E732-736.
351. Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA, et al. High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2009 Apr 21;119(15):2103–11.
352. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009;4(1):31–6.
353. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* Augusta Ga. 1998 Jan;9(1):1–11.
354. Guo L, Ai J, Zheng Z, Howatt DA, Daugherty A, Huang B, et al. High density lipoprotein protects against polymicrobe-induced sepsis in mice. *J Biol Chem*. 2013 Jun 21;288(25):17947–53.
355. Dai L, Datta G, Zhang Z, Gupta H, Patel R, Honavar J, Modi S, Wyss JM, Palgunachari M, Anantharamaiah GM et al: The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J Lipid Res* 2010, 51(9):2695-2705.
356. Freudenberg MA, Bøgg-Hansen TC, Back U, Galanos C. Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats. *Infect Immun*. 1980 May;28(2):373–80.
357. Calkin AC, Drew BG, Ono A, Duffy SJ, Gordon MV, Schoenwaelder SM, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation*. 2009 Nov 24;120(21):2095–104.
358. Michael Gibson C, Korjian S, Tricoci P, Daaboul Y, Yee M, Jain P, et al. Safety and Tolerability of CSL112, a Reconstituted, Infusible, Plasma-Derived Apolipoprotein A-I, After Acute Myocardial Infarction: The AEGIS-I Trial (ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes I). *Circulation*. 2016 Dec 13;134(24):1918–30.
359. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003 Nov 5;290(17):2292–300.




# ANNEXES

RESEARCH

Open Access



# Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit

Sébastien Tanaka<sup>1\*</sup> , Julien Labreuche<sup>2</sup>, Elodie Drumez<sup>2</sup>, Anatole Harrois<sup>1,3</sup>, Sophie Hamada<sup>1</sup>, Bernard Vigué<sup>1</sup>, David Couret<sup>4,5</sup>, Jacques Duranteau<sup>1,3</sup> and Olivier Meilhac<sup>4,5</sup>

## Abstract

**Background:** The protective cardiovascular effect of high-density lipoproteins (HDLs) is considered to chiefly rely on reverse cholesterol transport from peripheral tissues back to the liver. However, HDL particles display pleiotropic properties, including anti-inflammatory, anti-apoptotic or antioxidant functions. Some studies suggest that HDL concentration decreases during sepsis, and an association was reported between low HDL levels and a poor outcome. Like sepsis, trauma is also associated with a systemic inflammatory response syndrome. However, no study has yet explored changes in lipid profiles during trauma. We sought to compare lipid profiles between sepsis and trauma patients in intensive care unit (ICU). In septic patients, we analyzed the association between lipid profile, severity and prognosis.

**Methods:** A prospective, observational, single-centered study was conducted in a surgical ICU. For each patient, total cholesterol, HDL, triglyceride and low-density lipoprotein cholesterol levels were assessed at admission. Short-term prognosis outcome was prospectively assessed.

**Results:** Seventy-five consecutive patients were admitted (50 sepsis and 25 trauma). There was no difference in SOFA and SAPSII scores between the two groups. Patients with sepsis had lower total cholesterol levels than patients with trauma. Regarding the lipoprotein profile, only HDLs differed significantly between the two groups (median [IQR] = 0.33 mmol/l [0.17–0.78] in sepsis patients versus median [IQR] = 0.99 mmol/l [0.74–1.28] in trauma patients;  $P < 0.0001$ ). Whereas ICU mortality was not associated with lipid levels in the sepsis group, a significant negative correlation was found between HDL concentration and the length of ICU stay ( $r = -0.35$ ;  $P = 0.03$ ) in the group of survivor septic patients at ICU discharge. In addition, poor outcome defined as death or a SOFA score  $>6$  at day 3 was associated with lower HDL levels (median [IQR] = 0.20 mmol/l [0.11–0.41] vs. 0.35 mmol/l [0.19–0.86] in patients with poor outcome versus others;  $P = 0.03$ ).

**Conclusions:** Lipid profile was totally different between sepsis and trauma in ICU patients: HDL levels were low in septic patients, whereas their concentration was not altered in trauma patients. This major difference reinforces the necessity to explore the therapeutic potential of HDL in sepsis.

**Keywords:** Sepsis, Trauma, Lipids, Inflammation, High-density lipoproteins, ICU, Outcome

## Background

Sepsis remains an important cause of mortality in intensive care unit (ICU) despite a better comprehension of its pathophysiology [1, 2]. Sepsis pathways are complex,

including early activation of pro- and anti-inflammatory signaling, along with major non-immunological responses such as cardiovascular, neuronal, autonomic, hormonal and metabolic responses, as well as activation of coagulation [3].

High-density lipoproteins (HDLs) represent a family of particles characterized by their ability to transport cholesterol from peripheral tissues back to the liver that confers to them a cardiovascular protective effect [4, 5].

\*Correspondence: sebastiantanaka@hotmail.fr

<sup>1</sup> Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Service d'Anesthésie-Réanimation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Université Paris-Sud, Hôpital de Bicêtre, le Kremlin-Bicêtre, France  
Full list of author information is available at the end of the article

HDLs also appear to emerge as relevant players in both innate and adaptive immunity [6]. Because of their pleiotropic properties, including anti-inflammatory, anti-apoptotic or antioxidant functions, experimental studies have tested the efficacy of both reconstituted HDL and ApoA1 mimetic peptide perfusion in animal models of septic shock [7–9]. Some of these have demonstrated a protective effect of these HDL mimetics on mortality and shown a decrease in the inflammatory state [9–12]. Several clinical studies have been conducted to assess HDL concentration in septic conditions. Van Leeuwen et al. [13] underlined that in septic patients, HDL concentrations rapidly fall and can be reduced to 50% of recovery conditions. Chien et al. [14] have shown that low HDL levels at day 1 of severe sepsis were significantly associated with an increase in mortality and adverse clinical outcomes. In an observational study involving 151 consecutive septic patients, a low HDL concentration was independently related to 30-day mortality [15].

In trauma patients, a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) results from several mechanisms such as neutrophil stimulation [16] or the release of endogenous factors termed damage-associated molecular patterns (DAMPs) after tissue injury [17] leading to pro- and anti-inflammatory cytokine over-expression [18].

Whereas HDL levels were shown to be decreased during sepsis, to our knowledge, no study has explored the lipid profiles during severe injury.

The aim of the present study was to compare the lipid profiles between trauma and septic patients in ICU and to characterize the association between lipid profile, severity and prognosis.

## Methods

### Study design and patient selection

This was a prospective, observational, single-centered study conducted on 75 consecutive patients admitted to a surgical ICU of a 1000-bed, tertiary-level university hospital. Patients were recruited from July to September 2014. Criteria of inclusion were all adult trauma patients who had at least two SIRS criteria and all patients admitted to the ICU for severe sepsis or septic shock according to the Surviving Sepsis Campaign international guidelines [1]. Patients admitted with liver cirrhosis and who were immunocompromised (acquired immune deficiency syndrome, neutropenia of <1000 cells/ml or transplant surgery) were excluded from our study.

The study was approved by our local ethics committee (comité de protection des personnes de l'université Paris VII n° SC 13-026, ID RCB: 2013-A0141837), which waived the need for written informed consent because of the observational nature of the study.

### Data collection

Patient demographics, previous medical history and ICU admission diagnosis, Simplified Acute Physiology Score II (SAPSII), Sepsis-related Organ Failure Assessment score (SOFA), Injury Severity Score (ISS) for trauma patients and clinical outcomes were prospectively collected [19–21]. In case of sepsis, data on infection sites and on the type of bacteria were also collected.

For each patient, blood samples were collected at admission to the ICU to assess total cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels, leukocyte count, platelets, hematocrits, protein, creatinine and serum lactate. Analyses were performed in the biochemistry laboratory of the hospital. Concentrations of total cholesterol, triglycerides and HDL cholesterol were determined using routine enzymatic methods on a Bayer ADVIA 1650 analyzer, and LDL cholesterol was calculated according to the Friedewald equation. The normal range in our hospital was: LDL-C:  $N < 4.2$  mmol/l; HDL-C:  $1.0 < N < 2.0$  mmol/l; total cholesterol:  $3.4 < N < 6.2$  mmol/l; and triglyceride  $0.45 < N < 1.70$  mmol/l.

ICU mortality, duration of mechanical ventilation, length of stay in ICU and in hospital, need for dialysis and vasopressor therapy, and SOFA score at day 3 and day 7 were recorded as short-term prognosis outcomes. A patient with poor outcome was defined as dead or alive with a SOFA score >6 at day 3.

### Statistical analysis

Qualitative variables are expressed as numbers (percentages), and quantitative variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation or medians [interquartile range (IQR)] in the case of non-Gaussian distribution. Normality of distribution was checked graphically and by using the Shapiro–Wilk test.

Bivariate comparisons between the two study groups (sepsis vs trauma) were made using the Chi-square test (Fisher's exact test was used when the expected cell frequency was <5) for qualitative variables and the Student's *t* test for quantitative variables (or Mann–Whitney *U* test for non-Gaussian distribution). Between-group comparisons in lipid levels were further adjusted for age and sex using nonparametric analysis of covariance [22]. Given the large differences in age between the two study groups, we performed a sensitivity analysis restricted to age ( $\pm 5$  years)- and sex-matched patients of the two groups using Wilcoxon's signed-rank test.

In the subgroup of patients with sepsis, we investigated the association of lipid levels with sepsis severity at ICU admission (admission SOFA score, need for mechanical ventilation and its duration) and with sepsis short-term

prognosis outcomes (mortality in ICU, length of stay in ICU, poor outcome (SOFA score >6 or death) at day 3 and day 7) after adjustment for age and sex. We also investigated the association of lipid levels with bacterial species (gram-negative bacteria and gram-positive cocci) in the subgroup of septic patients. In the trauma group, we investigated the association of lipid levels with admission SOFA score, mechanical ventilation use and its duration, mortality in ICU and length of ICU stay. We used nonparametric covariance analysis to study the association of lipid levels with qualitative severity/outcome variables and partial Spearman's rank coefficient correlation to study the association of lipid levels with quantitative severity/outcome variables.

Given the small sample size and exploratory nature of the present study, we did not adjust for multiple comparisons. All statistical tests were performed at the two-tailed  $\alpha$  level of 0.05, and data were analyzed using the SAS software package, release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

## Results

### Lipid profile in trauma and septic patients

Of the 75 patients included in the present study, 50 were admitted for sepsis and 25 for trauma. As shown in Table 1, trauma patients were younger than septic patients ( $P < 0.0001$ ). There was no difference in SOFA and SAPSII scores between the two groups. Peritonitis was the most frequent source of sepsis infection ( $n = 22$ , 44%), followed by pyelonephritis ( $n = 11$ , 22%), angiocholitis ( $n = 9$ , 18%) and other sources ( $n = 8$ , 16%). Among septic patients, 14 of them (28%) were admitted

for sepsis and 36 (72%) for septic shock according to the recent Sepsis-3 definition [2].

As shown in Fig. 1, sepsis patients had lower total cholesterol levels than trauma patients. Regarding the lipoprotein profile, only HDL-C differed significantly between the two groups. Patients with sepsis were characterized by lower HDL-C levels (median [IQR] = 0.33 mmol/l [0.17–0.78]) relative to trauma patients (median [IQR] = 0.99 mmol/l [0.74–1.28]; age- and sex-adjusted  $P < 0.0001$ ). In sensitivity analysis restricted to age-/sex-matched patients of the two groups, a similar difference in HDL-C levels was found (median [IQR] = 0.19 mmol/l [0.14–0.92] vs. 0.98 mmol/l [0.70–1.30];  $P = 0.001$ ). These results are presented in Additional file 1: Table S1 in the online supplement information.

### Lipid profile and sepsis severity

In septic patients, the severity of the disease (assessed by SOFA score or the need for mechanical ventilation) was negatively associated with HDL-C, whereas no significant association was found with LDL-C and triglyceride levels (Table 2). We found a negative correlation between admission SOFA score and HDL-C levels ( $r = -0.50$ ,  $P = 0.0004$ ), and lower HDL-C levels in mechanically ventilated patients (median [IQR] = 0.21 mmol/l [0.13–0.45] versus 0.52 mmol/l [0.25–0.96] in patients not requiring mechanical ventilation;  $P = 0.029$ ).

### Lipid profile and sepsis outcome

Whereas ICU mortality was not associated with lipid levels in the sepsis group, (Table 2), a significant negative

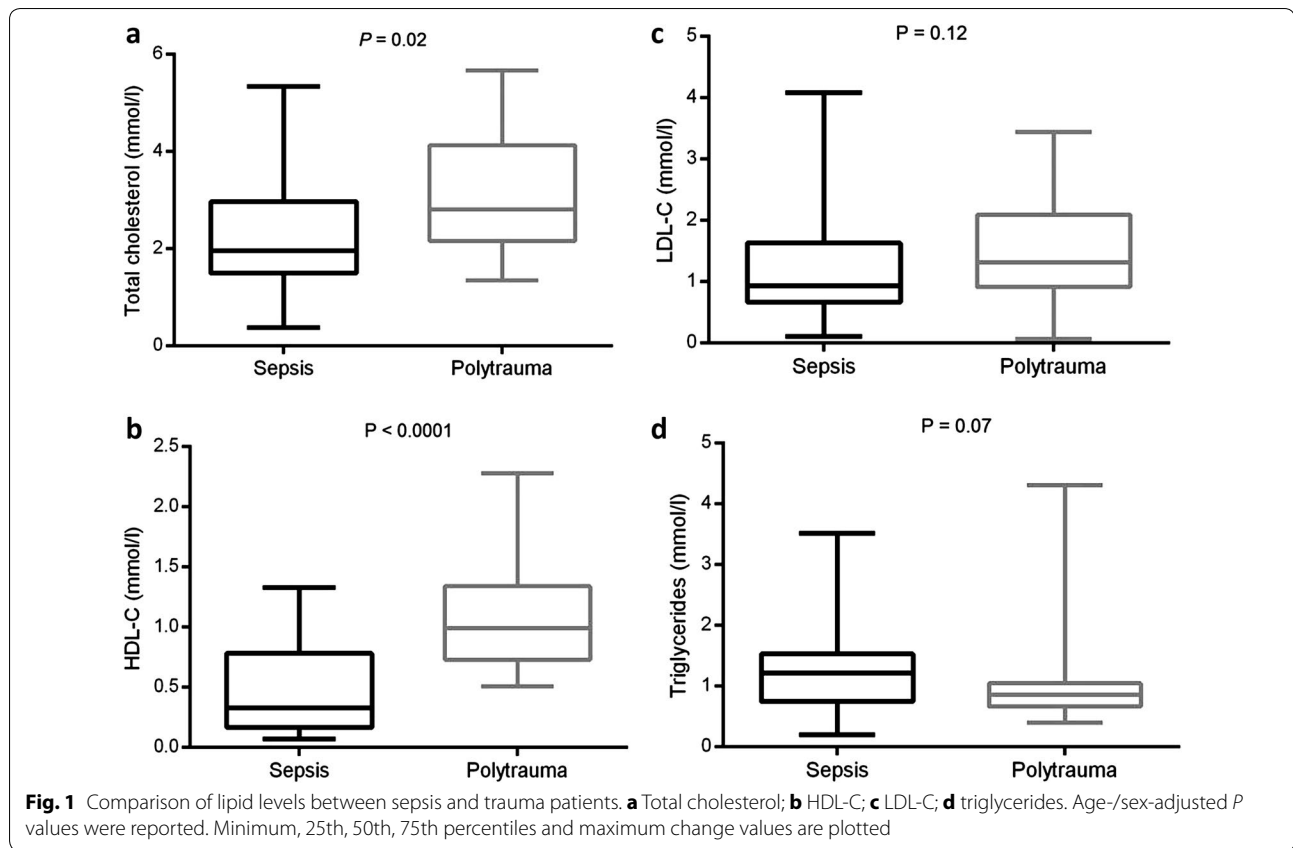
**Table 1** Main patient characteristics

Characteristics	Overall (n = 75)	Sepsis (n = 50)	Trauma (n = 25)	P*
Age (years)	62 [45–74]	68 [57–78]	38 [28–56]	<0.0001
Male	53 (70.7)	36 (72.0)	17 (68.0)	0.72
Weight (kg)	77.3 ± 16.0	76.0 ± 17.3	80.0 ± 13.0	0.31
Lipid medications <sup>a</sup>	7 (9.3)	6 (12.0)	1 (4.0)	0.41
ISS	–	–	29 [20–41]	–
SAPSII	40 [29–56]	42 [30–59]	39 [26–45]	0.31
SOFA day 1	7 [5–8]	7 [4–9]	7 [5–8]	0.89
Norepinephrine day 1 (µg/kg/min)	0.1 [0.0–0.4]	0.1 [0.0–0.4]	0.1 [0.0–0.3]	0.83
Glasgow score day 1	14 [13–15]	15 [14–15]	13 [7–15]	0.0033
Leukocytes/mm <sup>3</sup> day 1	14,000 [7180–21,280]	13,920 [7350–22,350]	14,250 [7180–19,200]	0.54
Hematocrit day 1 (%)	33 ± 7	33 ± 7	33 ± 7	0.83
Creatinine day 1 (mmol/l)	98 [69–136]	102 [71–163]	92 [63–99]	0.13
Protein (day 1 g/l)	54 ± 12	54 ± 13	54 ± 10	0.84
Lactates day 1 (mmol/l)	1.9 [1.3–2.3]	1.9 [1.3–2.6]	2.4 [1.3–3.2]	0.49

Values are frequencies (percentages), mean ± SD or medians [IQR]

\* P value for comparison between sepsis and trauma patients

<sup>a</sup> All these patients received statins



correlation was found between HDL-C and the length of ICU stay ( $r = -0.35$ ;  $P = 0.03$ ) in the group of survivor patients at ICU discharge.

In addition, poor outcome, defined as mortality or a SOFA score  $>6$  at day 3, was associated with low HDL-C levels (median [IQR] =  $0.20$  mmol/l [ $0.11$ – $0.41$ ] vs.  $0.35$  mmol/l [ $0.19$ – $0.86$ ] in patients with poor outcome vs. others;  $P = 0.03$ ).

#### Lipid profile and bacterial species

In the subgroup of sepsis patients, no association was found between gram-negative bacteria and lipid levels (Table 2), whereas the presence of gram-positive cocci was associated with higher HDL-C levels (median [IQR] =  $0.61$  mmol/l [ $0.25$ – $1.01$ ] in patients with vs.  $0.21$  [ $0.15$ – $0.37$ ] in patients without;  $P = 0.013$ ).

#### Lipid profile in the subgroup of trauma patients

With the exception of the length of ICU stay, we found no statistical link between lipid profile and trauma patient characteristics. These results are presented in Additional file 2: Table S2 in the online supplement information.

#### Discussion

In this study, we report that:

1. HDL-C levels were markedly low during sepsis, whereas no change was observed in the early phase of trauma relative to standard HDL concentrations.
2. Concerning LDL and TG levels, no difference was observed between sepsis and trauma.
3. In the sepsis subgroup, SOFA score, the need for mechanical ventilation and length of ICU stay were negatively associated with HDL-C levels at admission. No association between mortality and HDL-C levels was observed.

During sepsis, the dramatic decrease in HDL-C levels relative to normal conditions remains unexplained. Several hypotheses are possible, including an acute overconsumption of HDL particles, a decrease in liver HDL synthesis (especially in the case of hepatic failure) or an increased clearance following an upregulation of scavenger receptors such as SRB-1 [23]. HDL particles may also easily be redistributed from the intravascular to the extravascular compartment in the context of sepsis [13, 24]. One major action of HDL particles during sepsis is the clearance of bacterial components, such as lipopolysaccharides (LPS) [25]. After binding bacterial components, the clearance of HDL particles may also be increased in inflammatory conditions [25, 26].



**Table 2 Association of lipid levels with sepsis severity and short-term prognosis**

	TC		LDL-C		HDL-C		Triglycerides	
	Values	P*	Values	P*	Values	P*	Values	P*
<i>Severity variables</i>								
SOFA score at day 1 <sup>2</sup>	-0.31	0.032	0.23	0.11	-0.50	0.0004	0.14	0.34
Mechanical ventilation use <sup>1</sup>								
No (n = 23)	2.03 [1.53–3.56]	0.17	0.97 [0.66–2.20]	0.29	0.52 [0.25–0.96]	0.029	1.11 [0.79–1.32]	0.45
Yes (n = 27)	1.64 [1.38–2.55]		0.88 [0.68–1.36]		0.21 [0.13–0.45]		1.25 [0.62–1.57]	
Length of mechanical ventilation <sup>2</sup>	-0.20	0.17	-0.13	0.39	-0.39	0.006	0.23	0.11
<i>Bacterial species</i>								
Gram-negative bacteria <sup>1</sup>								
No (n = 10)	2.04 [1.64–3.74]	0.55	1.11 [0.71–1.97]	0.88	0.48 [0.19–0.96]	0.53	1.37 [1.03–2.14]	0.68
Yes (n = 35)	2.03 [1.29–2.83]		0.95 [0.63–1.61]		0.30 [0.15–0.62]		1.25 [0.82–1.53]	
Gram-positive cocci <sup>1</sup>								
No (n = 25)	1.81 [1.28–2.83]	0.37	0.93 [0.66–1.70]	0.83	0.21 [0.15–0.37]	0.013	1.32 [0.82–1.57]	0.57
Yes (n = 20)	2.07 [1.64–3.24]		0.97 [0.71–1.56]		0.61 [0.25–1.01]		1.24 [0.90–1.41]	
<i>Prognosis variables</i>								
Mortality in ICU <sup>1</sup>								
No (n = 40)	2.11 [1.56–3.17]	0.28	0.96 [0.70–1.66]	0.44	0.35 [0.17–0.83]	0.68	1.20 [0.81–1.56]	0.26
Yes (n = 10)	1.67 [1.26–2.11]		0.78 [0.42–1.36]		0.21 [0.17–0.55]		1.22 [0.44–1.32]	
Length of stay in ICU <sup>2</sup>	-0.21	0.21	-0.31	0.055	-0.35	0.030	0.21	0.20
SOFA score >6 or died at day 3 <sup>1</sup>								
No (n = 29)	2.40 [1.60–3.19]	0.003	1.03 [0.68–1.86]	0.013	0.35 [0.19–0.86]	0.033	1.25 [0.88–1.53]	0.078
Yes (n = 15)	1.53 [1.09–2.11]		0.77 [0.42–0.99]		0.20 [0.11–0.41]		0.79 [0.44–1.32]	
SOFA score >6 or died at day 7 <sup>1</sup>								
No (n = 15)	1.64 [1.52–2.55]	0.43	0.85 [0.67–1.03]	0.68	0.30 [0.11–0.78]	0.20	1.09 [0.79–1.57]	0.93
Yes (n = 13)	1.62 [1.28–2.11]		0.87 [0.42–1.26]		0.17 [0.12–0.37]		1.25 [0.61–1.53]	

Values are medians of lipid levels reported in mmol/l [IQR] or partial Spearman's correlation coefficient

\* Age-/sex-adjusted P values (<sup>1</sup>calculated using nonparametric ANCOVA; <sup>2</sup>calculated using partial Spearman's rank correlation)

Interestingly, in the population of septic patients studied here, HDL concentration was higher in patients with gram-positive versus gram-negative bacteria, suggesting that the clearance of HDL-LPS particles may be enhanced.

Both sepsis and trauma are characterized by an intense systemic inflammation that results from a disproportionate activation of inflammation signaling pathways [16, 27, 28]. In these two pathologies, cell injury initiates the secretion of different mediators such as DAMPs, which are recognized by the host, leading to a pro-inflammatory response [3, 29]. Also, similar leukocyte genomic responses to inflammation may be involved in both trauma and sepsis patients [30]. However, despite a common inflammatory background, we did not observe a similar lipid profile between sepsis and trauma patients. To our knowledge, except in spinal cord injury [31], lipid profile and especially HDL-C concentration have never been compared between trauma and septic patients. In this context, we show, for the first time, that in the early phase of trauma, HDL levels are preserved, contrasting

with sepsis. The mechanisms that may explain the HDL-C level differences between trauma and sepsis remain unknown, but the interaction between HDL particles and LPS may be one of the causes [23]. The marked release of bacterial endotoxins may lead to an increased consumption of HDL particles.

This discrepancy between sepsis and trauma patients emphasizes the potential protective role of HDLs during sepsis. In view of HDL over-consumption and clearance in sepsis, their previously described pleiotropic effects may be lacking for the control of inflammation associated with this condition [7, 23].

Concerning the relationship between HDL-C levels and prognosis in septic patients, results of previous studies are controversial. On the one hand, Chien et al. [14] have shown that HDL-C levels in non-survivors were significantly lower than those of survivors from day 1 to day 4 and that HDL-C concentration at day 1 could predict the overall 30-day mortality rate. In their study, the cutoff value of 0.52 mmol/l had a sensitivity of 92% and a specificity of 80% for predicting the overall 30-day mortality

rate. Barlage et al., in an observational study in ICU, also underlined the relationship between apo-A1 levels and 30-day mortality [15]. On the other hand, Lee et al. [32] reported no significant HDL-C differences between survivors and non-survivors in 117 septic patients. Only TG levels were associated with mortality.

Our study was not designed to test a potential difference in mortality but rather to compare trauma and septic patients. Comparing with the studies of Chien et al. and Barlage et al., the limited number of patients and the low proportion of sepsis in our cohort may explain this lack of relationship between HDL concentration and mortality. However, we found that death or a SOFA score >6 at day 3 was associated with low HDL-C levels. To our knowledge, only one previous study has explored the relationship between HDL concentrations at admission and organ failure progression: Cirstea et al. [33] have recently reported that low HDL-C levels at the time of admission for suspected sepsis were strongly and independently prognostic of subsequent multiple organ dysfunction.

One major finding of our study was that SOFA score, need for and duration of mechanical ventilation and length of ICU stay were all negatively associated with HDL-C levels. This result concerning length of ICU stay was similar to that found by Chien and al. [14]. Concerning SOFA score evaluation at day 1, our results are in line with those of Ferreira et al., showing that the sequential assessment of organ dysfunction during the first days of ICU admission was clinically relevant and a good indicator of prognosis [34].

Our study has some limitations. The first limitation is the marked difference in age between sepsis and trauma groups. A sensitivity analysis restricted to age-/sex-matched patients from the two groups was performed, and the lower levels in HDL-C in sepsis relative to trauma patients were confirmed. In addition, most cross-sectional studies in the general population report no difference in HDL levels between young and older subjects [35–38]. Taken together, age adjustment, sensitivity analysis and bibliographic data support our conclusion that HDL level differences are indeed due to septic conditions.

Second, we were not allowed to collect information on race and familial disorders of lipid metabolism which can affect the lipid levels.

Third, we have not measured inflammatory markers such as cytokines/chemokines in the two groups of patients. In this context, it is not possible to compare the inflammatory state between trauma and septic patients. However, SAPSII and SOFA scores were collected and no differences were found between trauma and septic

patients, suggesting that these two groups of patients were comparable in terms of gravity.

Fourth, we analyzed lipid levels only at ICU admission. No additional measures were performed in the early phase of sepsis (i.e., at emergency room admission) and during the stay in ICU. Comparison between the basal lipid levels (i.e., without any episode of sepsis or trauma before admission to hospital) and the pathologic condition in the same patient would be of interest.

Fifth, peritonitis, urinary tract infection and angiocholitis are the main causes of sepsis recruitment in our surgical ICU, which is quite different from other ICUs and especially medical ICUs, which may explain some differences. The ability of HDL to bind and promote LPS clearance in cases of infection by gram-negative pathogens may also impact our results because our sepsis population involved more gram-negative pathogens.

Finally, additional studies with appropriate sample size calculation should be performed, with a larger number of patients. Our study is exploratory, with a limited sample size; our conclusion should therefore be taken with caution.

Regarding the main finding of our study, further experimental studies should be conducted to understand the reasons for the low HDL concentration during sepsis. In addition, a lipidomics approach may also be of interest. Dysfunctional HDLs during sepsis may represent an explanation for the observed organ dysfunction during sepsis [23]. The interaction between HDL particles and bacterial components, such as LPS, should also be addressed in future experimental studies. Finally, because of the pleiotropic effects of HDLs, therapeutic injection of HDL mimetic peptides or reconstituted HDLs may be of interest and should be tested in preclinical settings.

## Conclusion

Our study has demonstrated that the lipid profile was different between sepsis and trauma ICU patients. HDL-C levels were low in septic patients, whereas their concentration was not altered in the case of trauma. This major difference reinforces the necessity to explore the therapeutic potential of HDL in sepsis.

In the subgroup of sepsis, SOFA score, need for and duration of mechanical ventilation and length of ICU stay were all negatively associated with HDL-C levels.

Our study suggests that HDLs may play an important role in sepsis. Further studies enrolling more patients, and especially septic patients, are necessary to test whether low HDL levels are a bystander prognosis marker of mortality or whether HDLs may limit the deleterious effects of sepsis.

## Additional files

**Additional file 1.** Sensitivity analysis in age/sex-matched patients from the two groups.

**Additional file 2.** Association of lipid levels with trauma severity and short-term prognosis.

**Additional file 3.** Manuscript database.

## Abbreviations

DAMPs: damage-associated molecular patterns; HDL: high-density lipoprotein; ICU: intensive care unit; ISS: injury severity score; LPS: lipopolysaccharides; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment Score; SAPSII: Simplified Acute Physiology Score II; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; TG: triglyceride.

## Authors' contributions

ST participated in study design, acquisition of data, analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. JL and ED performed the statistical analysis, were involved in the analysis and interpretation of data and helped to draft the manuscript. AH, SH and BV have made substantial contributions to acquisition of data and analysis. DC was involved in the analysis and interpretation of data. JD and OM participated in the design of the study, were involved in the analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

## Author details

<sup>1</sup> Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Service d'Anesthésie-Réanimation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Université Paris-Sud, Hôpital de Bicêtre, le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>2</sup> Département de biostatistique, Université de Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique, épidémiologie et qualité des soins, 59000 Lille, France. <sup>3</sup> Laboratoire d'étude de la Microcirculation, « Bio-CANVAS: biomarqueurs in CardioNeuroVascular DISEASES », UMRs 942, Paris, France. <sup>4</sup> Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DéTRO), Saint-Denis, France. <sup>5</sup> CHU de La Réunion, Saint-Denis, France.

## Acknowledgements

The authors thank the physicians and nursing staff of the Bicêtre hospital's ICU for their valuable cooperation and Patricia Girard for collecting clinical data. The authors would like to thank Dr. Mary Osborne-Pellegrin for help in editing the manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Availability of data and materials

The database supporting the conclusion of this article is joined to the manuscript as supplemental data (Additional file 3).

## Ethics approval and consent to participate

The study was approved by our local ethics committee (comité de protection des personnes de l'université Paris VII n° SC 13-026, ID RCB: 2013-A0141837), which waived the need for written informed consent because of the observational nature of the study.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 9 February 2017 Accepted: 26 May 2017

Published online: 06 June 2017

## References

- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 2013;39(2):165–228.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801–10.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013;369(9):840–51.
- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 2002;161(1):1–16.
- Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, De Backer G, Jousilahti P, Keil U, Thomsen T, et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis.* 2009;206(2):611–6.
- Norata GD, Pirillo A, Ammirati E, Catapano AL. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis.* 2012;220(1):1–21.
- Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, Burillo E, Michel JB, Levoe A, Martin-Ventura JL, et al. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol.* 2013;169(3):493–511.
- McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, Cuzzocrea S, Mota-Filipe H, Hinds CJ, Miller NE, Thiernemann C. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock.* 2003;20(6):551–7.
- Dai L, Datta G, Zhang Z, Gupta H, Patel R, Honavar J, Modi S, Wyss JM, Palgunachari M, Anantharamaiah GM, et al. The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J Lipid Res.* 2010;51(9):2695–705.
- Zhang Z, Datta G, Zhang Y, Miller AP, Mochon P, Chen YF, Chatham J, Anantharamaiah GM, White CR. Apolipoprotein A-I mimetic peptide treatment inhibits inflammatory responses and improves survival in septic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(2):H866–73.
- Gupta H, Dai L, Datta G, Garber DW, Grenett H, Li Y, Mishra V, Palgunachari MN, Handattu S, Gianturco SH, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by an apolipoprotein A-I mimetic peptide. *Circ Res.* 2005;97(3):236–43.
- Zhang X, Wang L, Chen B. Recombinant HDL (Milano) protects endotoxin-challenged rats from multiple organ injury and dysfunction. *Biol Chem.* 2015;396(1):53–60.
- van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2003;31(5):1359–66.
- Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, Yang PC. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med.* 2005;33(8):1688–93.
- Barlage S, Gnewuch C, Liebisch G, Wolf Z, Audebert FX, Gluck T, Frohlich D, Kramer BK, Rothe G, Schmitz G. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med.* 2009;35(11):1877–85.
- Hazeldine J, Hampson P, Lord JM. The impact of trauma on neutrophil function. *Injury.* 2014;45(12):1824–33.
- Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care.* 2012;2(1):27.
- Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ, Koenderman L, Kubek P, Lilford RJ. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet.* 2014;384(9952):1455–65.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the working group on sepsis-related problems of the European society of intensive care medicine. *Intensive Care Med.* 1996;22(7):707–10.

20. Antonelli M, Moreno R, Vincent JL, Sprung CL, Mendonça A, Passariello M, et al. Application of SOFA score to trauma patients. Sequential organ failure assessment. *Intensive Care Med.* 1999;25(4):389–94.
21. Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma.* 1974;14(3):187–96.
22. LaVange LM, Koch GG. Rank score tests. *Circulation.* 2006;114(23):2528–33.
23. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in infectious diseases and sepsis. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;224:483–508.
24. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, Barie PS, Rubin AL. Relationship of hypolipidemia to cytokine concentrations and outcomes in critically ill surgical patients. *Crit Care Med.* 2001;29(8):1563–8.
25. Vesly CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun.* 2000;68(5):2410–7.
26. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med.* 1994;180(3):1025–35.
27. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury.* 2007;38(12):1336–45.
28. Binkowska AM, Michalak G, Slotwinski R. Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):206–16.
29. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464(7285):104–7.
30. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(9):3507–12.
31. Gilbert O, Croffoot JR, Taylor AJ, Nash M, Schomer K, Groah S. Serum lipid concentrations among persons with spinal cord injury—a systematic review and meta-analysis of the literature. *Atherosclerosis.* 2014;232(2):305–12.
32. Lee SH, Park MS, Park BH, Jung WJ, Lee IS, Kim SY, Kim EY, Jung JY, Kang YA, Kim YS, et al. Prognostic implications of serum lipid metabolism over time during sepsis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:789298.
33. Cirstea M, Walley KR, Russell JA, Brunham LR, Genga KR, Boyd JH. Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an early prognostic marker for organ dysfunction and death in patients with suspected sepsis. *J Crit Care.* 2017;38:289–94.
34. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA.* 2001;286(14):1754–8.
35. Heitmann BL. The effects of gender and age on associations between blood lipid levels and obesity in Danish men and women aged 35–65 years. *J Clin Epidemiol.* 1992;45(7):693–702.
36. Heiss G, Tamir I, Davis CE, Tyroler HA, Rifkind BM, Schonfeld G, et al. Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study. *Circulation.* 1980;61(2):302–15.
37. Abbott RD, Garrison RJ, Wilson PW, Epstein FH, Castelli WP, Feinleib M, et al. Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes. The Framingham study. *Arterioscler Dallas Tex.* 1983;3(3):260–72.
38. Wilson PW, Anderson KM, Harris T, Kannel WB, Castelli WP. Determinants of change in total cholesterol and HDL-C with age: the Framingham Study. *J Gerontol.* 1994;49(6):M252–7.

Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](http://springeropen.com)


---

RESEARCH

Open Access



# High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients

Sébastien Tanaka<sup>1,2</sup>, Dévy Diallo<sup>3</sup>, Sandrine Delbosc<sup>3</sup>, Claire Genève<sup>2</sup>, Nathalie Zappella<sup>2</sup>, Jennyfer Yong-Sang<sup>1</sup>, Jessica Patche<sup>1</sup>, Anatole Harrois<sup>4,5</sup>, Sophie Hamada<sup>4</sup>, Erick Denamur<sup>6</sup>, Philippe Montravers<sup>2,7</sup>, Jacques Duranteau<sup>4,5</sup> and Olivier Meilhac<sup>1,8,9\*</sup> 

## Abstract

**Background:** Sepsis is associated with systemic inflammation that may impact lipoprotein function. In particular, high-density lipoproteins (HDLs) that display pleiotropic protective roles may be dysfunctional in septic conditions. The aim of this study was to evaluate the HDL profile and the inflammatory context in septic shock patients admitted to our intensive care unit (ICU).

**Methods:** In this study, 20 septic shock patients and 20 controls (ICU patients without septic shock) were included. Plasma samples were collected on days 1, 2 and 7. Total cholesterol and lipoprotein concentrations were determined. HDL profiles were obtained using the Lipoprint<sup>®</sup> System (non-denaturing electrophoresis). Quantification of pro-inflammatory cytokines (interleukin 1b, 6 and 8), cell-free DNA and lipopolysaccharide-binding protein was also performed.

**Results:** HDL concentration was statistically lower in septic shock patients than in controls. At days 1 and 2, septic patients had significantly more large-sized HDL than control patients. Patients recovered a normal lipid profile at day 7.

**Conclusions:** Our results emphasize that HDL levels are dramatically decreased in the acute phase of septic shock and that there is a shift toward large HDL particles, which may reflect a major dysfunction of these lipoproteins. Further mechanistic studies are required to explore this shift observed during sepsis.

**Keywords:** Inflammation, Intensive care unit, Lipoprint, Lipid profile, Sepsis, High-density lipoproteins, Size

## Background

Sepsis is still the major cause of mortality in critically ill patients [1–3]. Inflammation associated with sepsis is characterized by increased levels of circulating biomarkers including chemokines, cytokines, coagulation factors, etc., that reflect and participate in organ dysfunction [4, 5]. Previous studies have suggested that during sepsis, multiple organ dysfunctions are consecutive to

endothelial alterations leading to platelet and leukocyte activation and/or coagulation pathway perturbations [6, 7]. High-density lipoproteins (HDLs), in addition to their function of reverse cholesterol transport [8, 9], display pleiotropic properties such as the induction of nitric oxide (NO) production by endothelial cells [10], inhibition of platelet activation [11] or the capacity to neutralize lipopolysaccharides (LPS) [12, 13]. HDLs have also been reported to modulate neutrophil activation as the endothelial response to pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha [14]. HDLs may bind to enzymes such as paraoxonase (PON1) or platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) which display antioxidant and

\*Correspondence: [olivier.meilhac@inserm.fr](mailto:olivier.meilhac@inserm.fr)

<sup>9</sup> INSERM U1188 Diabète athérothrombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROU), Université de La Réunion au CYROI, 2, Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France  
Full list of author information is available at the end of the article

endothelium protective properties [13]. Both PON1 and PAF-AH have been shown to limit lipid oxidation [13, 15].

In the cardiovascular field, both HDL cholesterol (HDL-C) concentration and HDL particle size were independently associated with cardiovascular risk [16]. In particular, large HDL particles appear to be protective in coronary artery disease [17, 18]. To our knowledge, HDL size has never been explored in septic patients.

Clinical studies have emphasized that HDL-C rapidly decreased during sepsis [19, 20] and that low levels of HDL-C are associated with increased mortality and adverse clinical outcomes during sepsis [21–23]. In a previous study, we have compared HDL profiles between septic and trauma patients [20]. Although inflammation was exacerbated in these two entities, HDL-C levels were low in septic patients, whereas their concentration was not altered in cases of trauma. The anti-inflammatory properties of HDLs and their capacity to limit endothelial activation are thus decreased in septic conditions. We hypothesized that in addition to reduced HDL concentration, their size may be modified in septic conditions.

## Materials and methods

The aim of the present study was to characterize HDL particles concentration and size in septic shock patients hospitalized in our intensive care unit.

### Patients

The study was performed in a surgical intensive care unit (ICU) of a 1000-bed tertiary referral university hospital. All adult patients admitted to the ICU were enrolled in this prospective observational study when they fulfilled the criteria for septic shock according to the Surviving Sepsis Campaign International Guidelines. This study was approved by our local ethics committee (Comité de Protection des Personnes de l'Université Paris VII no SC 13-026), which waived the need for written informed consent because of the observational nature of the study. During this period, all non-septic patients hospitalized in the ICU were prospectively included in a control group.

No differences for age or sex were observed between the two groups. The main ICU admission diagnoses were severe trauma, acute severe bleeding, acute brain injury or intracerebral hemorrhage. Immuno-compromised patients (AIDS, neutropenia of < 1000 cells/mL or transplant surgery) and patients with liver cirrhosis were excluded from the study.

According to our local procedures, early enteral feeding was always preferred. If the enteral route was not possible, a parenteral nutrition was administered and changed for enteral nutrition as soon as possible. Some patients received both enteral and parenteral nutrition.

### Data collection

Demographic data were collected at the patient's admission (age, sex, SAPSII, SOFA score, weight, previous medical history and especially dyslipidemia and ICU admission diagnosis). Hyperlipidemia is defined as an elevation of the fasting total cholesterol concentration, which may or may not be associated with increased triglyceride concentration. Statin treatment is recommended according to international guidelines [24]. Blood was sampled at days 1, 2 and 7 after admission for determination of total cholesterol, HDL-C, triglycerides, LDL cholesterol (LDL-C), protein concentrations and leukocyte count.

### Determination of HDL profiles by the Quantimetrix Lipoprint® HDL system

HDL size profiles were obtained using Lipoprint technology (Eurobio, France). The separation of HDL subfractions in plasma was achieved using this non-denaturing electrophoresis system. Precast high-resolution 8.5% polyacrylamide gel tubes were used. Briefly, 40 µl of sample was mixed with 300 µl of loading gel. This mixture was added to the top of the gel tubes, and a photo polymerization was carried out at room temperature for 30 min. Then, the gel tubes containing samples were electrophoresed for 54 min with 3 mA/gel. When the electrophoresis was finished, the gel tubes were left to rest for 30 min before scanning. This incubation at ambient temperature was added to the protocol to increase the uniformity of the bands. After scanning with a ScanMaker 8700 digital scanner (Mikrotek Co, USA), analysis with lipoware software was performed and the different bands (fractions of lipoproteins) were identified by their mobility (Rf) using a starting reference point and a leading point.

### Apolipoprotein A-I ELISA

The plasma apo A-I concentration was determined using a commercial kit (Mabtech, Sweden). The whole procedure was performed at room temperature. A high protein-binding ELISA plate was coated overnight with mAb HDL diluted to 2 µg/ml in PBS, pH 7.4 (100 µl in each well). The plate was washed twice with PBS, and blocked by adding 150 µl (by well) of PBS containing 0.05% Tween 20 and 0.1% BSA (incubation buffer) and leaving for 1 h. Five washes were then performed with PBS containing 0.05% Tween 20. 100 µl per well of diluted patient's plasma (1:100,000) and standards (dilution range from 50 to 0 ng/ml) was incubated for 2 h. A washing step similar to the second one was then performed. Then, 100 µl/well of mAb HDL linked to biotin at 0.5 µl/ml was added and incubated for 1 h after which another washing step was

performed. Streptavidin-HRP diluted at 1:1000 in incubation buffer was then added (100 µl/well). After 1 h of incubation followed by five washes, 100 µl of substrate were added to each well, and after 5 min, the colorimetric reaction was stopped by adding 50 µl of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. The optical density was measured at 405 nm.

#### LPS-binding protein (LBP) ELISA

LBP concentrations were measured using a commercial ELISA kit (Cell Sciences Inc), samples were diluted 1:1000, and the assay was carried out according to the manufacturer's protocol, with a standard curve ranging from 5 to 50 µg/mL.

#### Cell-free DNA quantification

Determination of the quantity of free DNA in plasma of patients was achieved using Quantit™ Picogreen dsDNA Reagent (Life technologies, France), as previously described [25].

#### Cytokines ELISA tests

All plasma samples were diluted fourfold with Bio-Plex sample diluents. Samples were analyzed for three different cytokines (IL-1b, IL-6 and IL-8) by a Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay (Bio-Rad Laboratories,

Inc., Hercules, CA, USA), according to the supplier's instructions.

#### Statistical analysis

Continuous variables are expressed as median (interquartile range), and categorical variables are expressed as frequencies (percentages). Categorical variables were compared by the Chi-Square test or Fisher's exact test when expected cell frequency was <5. Continuous variables were compared by the Mann–Whitney U test. The Spearman rank coefficient was calculated for evaluating correlations. For all tests,  $P < 0.05$  was considered significant. Graphpad Prism 4.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis.

## Results

### Patients

Twenty septic and 20 control patients were consecutively included in our study. The baseline characteristics of the subjects are presented in Table 1. Most of the septic shock patients had peritonitis or pneumonia, whereas controls had suffered multiple trauma, intracerebral hemorrhage or acute severe bleeding. The SOFA score was significantly higher in the septic group where patients required more norepinephrine and more mechanical ventilation.

**Table 1 Demographic and clinical data of septic shock and non-septic patients**

	Septic shock (n = 20)	Control (n = 20)	P
Age [years (Q1–Q3)]	68 (59.2–76.7)	70.5 (54.2–75.5)	0.65
Male [n (%)]	17 (85)	13 (65)	0.14
BMI [kg/m <sup>2</sup> (Q1–Q3)]	24.70 (20.2–28.6)	25 (20.2–30.5)	0.65
Dyslipidemia [n (%)]	5 (25)	3 (15)	0.69
Statin medication [n (%)]	3 (15)	0 (0)	0.23
SAPSII (Q1–Q3)	39 (29–59.5)	38 (30–51)	0.73
SOFA score (Q1–Q3)	8 (8–10)	6 (4–8)	<0.001
Mechanical ventilation [n (%)]	20 (100)	14 (70)	0.02
Need for norepinephrine [n (%)]	20 (100)	11 (55)	0.001
Norepinephrine (micg/kg/min)	0.42 (0.31–0.64)	0.12 (0.0–0.27)	<0.001
Enteral nutrition [n (%)]	12 (60)	18 (90)	0.065
Parenteral nutrition [n (%)]	5 (25)	2 (10)	0.41
Diagnosis at admission [n (%)]			
Peritonitis	10 (50)	–	–
Pneumonia	5 (25)	–	–
Cellulitis	2 (10)	–	–
Arthritis	1 (5)	–	–
Hepatic abscess	1 (5)	–	–
Trauma	–	6 (30)	–
Intracerebral hemorrhage	–	6 (30)	–
Traumatic brain injury	–	5 (25)	–
Hemorrhagic shock	–	2 (10)	–

Results are expressed as medians (IQR). Between-group differences were analyzed by a Mann–Whitney test, and a Chi-square test

Except for these parameters, there was no significant difference in baseline characteristics between septic shock cases and controls. In particular, the SAPSII score was not different between the two groups. In order to assess the host response to bacterial exposure, LPS-binding protein (LBP) concentration was measured in plasma. This protein has been used as a potential biomarker reflecting the innate immune response to microbial products. Interestingly, plasma LBP levels were higher in septic versus non-septic cases at day 1 (Table 2). Neutrophil activation by bacterial material may lead to the production of NETs (neutrophil extracellular traps) that can be detected in plasma by measuring cell-free DNA. This marker was also increased under septic conditions at day 1 (Table 2). Finally, patients experiencing a septic shock presented higher cytokine concentrations than control patients, as measured at day 1 (IL-1b = 44.4 pg/ml (20.6–86) versus 16.6 pg/ml (9.9–29),  $p = 0.016$ ; IL-6 = 3363 pg/ml (1069–13,968) versus 317 pg/ml (118–604),  $p < 0.001$ ; IL-8 = 357 pg/ml (187–753) versus 89 pg/ml (62–121),  $p < 0.001$ ) (Additional File 1: Fig. S1).

Concerning outcome, mortality was 15% ( $n = 3$ ) in the septic group and 10% ( $n = 2$ ) in the non-septic group at day 7 ( $P = 1.0$ ). At day 28, mortality in the septic group patients rose to 25% ( $n = 5$ ) and 20% ( $n = 4$ ) in the non-septic group ( $P = 1.0$ ).

#### Lipid profile in septic shock cases and controls

Concentrations of total cholesterol and HDL/LDL-C, but not of triglycerides, were lower in septic shock cases than

in controls within 48 h of admission (Table 3). Case–control differences at 24 h were similar to those observed at 48 h for all lipid parameters. The major difference observed between septic and non-septic patients was found for HDL-C that remained significantly different between groups, even at day 7 (whereas septic patients recovered similar LDL-C levels to those of controls). Apolipoprotein A1 concentration was not statistically different at days 2 and 7. Among septic shock cases and controls, we investigated the association of HDL-C with SOFA, SAPSII, LBP and cf-DNA. At day 1, significant negative correlations were observed between HDL-C and cf-DNA ( $r = -0.74$ ,  $P < 0.0001$ ) and LBP ( $r = -0.31$ ,  $P = 0.004$ ), but not with SOFA and SAPSII scores (all  $P > 0.11$ ). No correlation was observed between HDL concentration and patient outcome (mortality and length of stay in ICU) in either septic or control patients.

#### Lipoprint analysis

A major change in the distribution of HDL particles was observed in septic versus non-septic patients. A statistically significant decrease in small and intermediary fractions, in parallel with an increase in large particles, was observed at 24 h and at 48 h in septic versus non-septic patients (Fig. 1). At day 7, septic patients presented similar HDL profiles to those of non-septic subjects (Fig. 1). Thus, in addition to decreased levels of HDL-C, the remaining HDL particles were larger in septic versus non-septic patients. While we described a significant difference in HDL size between septic and non-septic

**Table 2 Biological data of septic shock and non-septic patients at day 1, day 2 and day 7**

	At day 1		At day 2		At day 7	
	Median or % (Q1–Q3)	<i>p</i>	Median or % (Q1–Q3)	<i>P</i>	Median or % (Q1–Q3)	<i>p</i>
Total serum proteins (g/L)						
Non-septic patients	64.5 (55.2–68.7)	0.16	60 (51–62)	0.01	62 (56.5–69.7)	0.06
Septic shock	55 (49.5–65.2)		50.5 (45.5–54.2)		57 (51–52.7)	
Leukocyte/mm <sup>3</sup>						
Non-septic patients	13,460 (8400–15,210)	0.53	11,270 (8630–13,790)	0.09	9070 (6970–12,200)	0.44
Septic shock	13,925 (9000–20,155)		13,945 (10,048–17,133)		10,290 (7910–15,670)	
Neutrophils/mm <sup>3</sup>						
Non-septic patients	10,710 (6318–13,895)	0.84	9640 (8605–11,565)	0.41	7620 (5033–12,833)	0.86
Septic shock	10,120 (6850–18,900)		12,475 (6958–15,788)		7490 (5870–12,425)	
LBP (μg/mL)						
Non-septic patients	39.3 (23.7–47.5)	<0.001	44.3 (37.8–49.6)	0.09	46.6 (28.9–52.5)	0.45
Septic shock	47.9 (45–49.7)		48.9 (44.4–50.9)		48.8 (43.1–51.3)	
cf-DNA (ng/mL)						
Non-septic patients	582.1 (529.3–694.3)	<0.0001	730.2 (571.8–806.5)	<0.0001	866.6 (754.4–958.9)	0.84
Septic shock	980.9 (872.4–1323)		975.1 (841.6–1157)		835.8 (749.3–1023)	

Continuous variables are expressed as medians (interquartile range), and categorical variables are expressed as frequencies (percentages)

A Mann–Whitney test was used for this analysis



**Table 3 Lipid parameters in septic patients and controls**

Lipid profile at day 1	Septic shock (n = 20)	Non-septic patients (n = 20)	p
Total cholesterol, mmol/l	2.1 [1.6–2.7]	4.0 [3.1–4.8]	< 0.0001
mg/dl	82 [62–105]	156 [121–187]	
LDL-C, mmol/l	1.0 [0.8–1.6]	2.3 [1.4–2.9]	0.001
mg/dl	39 [31–62]	89 [54–112]	
HDL-C (mmol/l)	0.4 [0.3–0.7]	1.3 [1.0–1.5]	<0.0001
mg/dl	15 [12–27]	50 [39–58]	
Triglycerides, mmol/l	0.9 [0.7–1.7]	1.0 [0.7–1.2]	0.69
mg/dl	80 [62–150]	88 [62–106]	
Apolipoprotein-A1, mg/l	916 [315–2543]	2482 [1428–5518]	0.05
Lipid profile at day 2	Septic shock (n = 18)	Non-septic patients (n = 19)	p
Total cholesterol, mmol/l	1.8 [1.2–2.9]	3.2 [2.7–3.9]	0.001
mg/dl	70 [47–113]	125 [105–152]	
LDL-C, mmol/l	0.9 [0.4–1.5]	1.5 [1.1–2.2]	0.02
mg/dl	35 [15–58]	58 [43–86]	
HDL-C, mmol/l	0.3 [0.2–0.6]	1.0 [0.9–1.4]	<0.0001
mg/dl	12 [8–24]	39 [35–54]	
Triglycerides, mmol/l	1.4 [0.9–1.7]	1.0 [0.8–1.1]	0.16
mg/dl	124 [80–150]	88 [71–97]	
Apolipoprotein-A1, mg/l	787 [357–2234]	1562 [965–3101]	0.22
Lipid profile at day 7	Septic shock (n = 15)	Non-septic patients (n = 12)	p
Total cholesterol, mmol/l	2.7 [1.7–3.5]	3.4 [2.2–3.8]	0.29
mg/dl	105 [66–136]	132 [86–148]	
LDL-C, mmol/l	1.5 [0.9–2.0]	1.8 [1.4–2.5]	0.38
mg/dl	58 [35–77]	70 [54–97]	
HDL-C, mmol/l	0.4 [0.3–0.6]	0.7 [0.5–1.2]	0.04
mg/dl	15 [12–24]	27 [19–46]	
Triglycerides, mmol/l	1.3 [1.1–1.6]	1.0 [0.9–1.5]	0.25
mg/dl	115 [97–142]	88 [80–133]	
Apolipoprotein-A1, mg/l	1340 [391–1922]	962 [508–3752]	0.98

Results are expressed as medians (IQR). The statistical differences were analyzed by a Mann–Whitney test

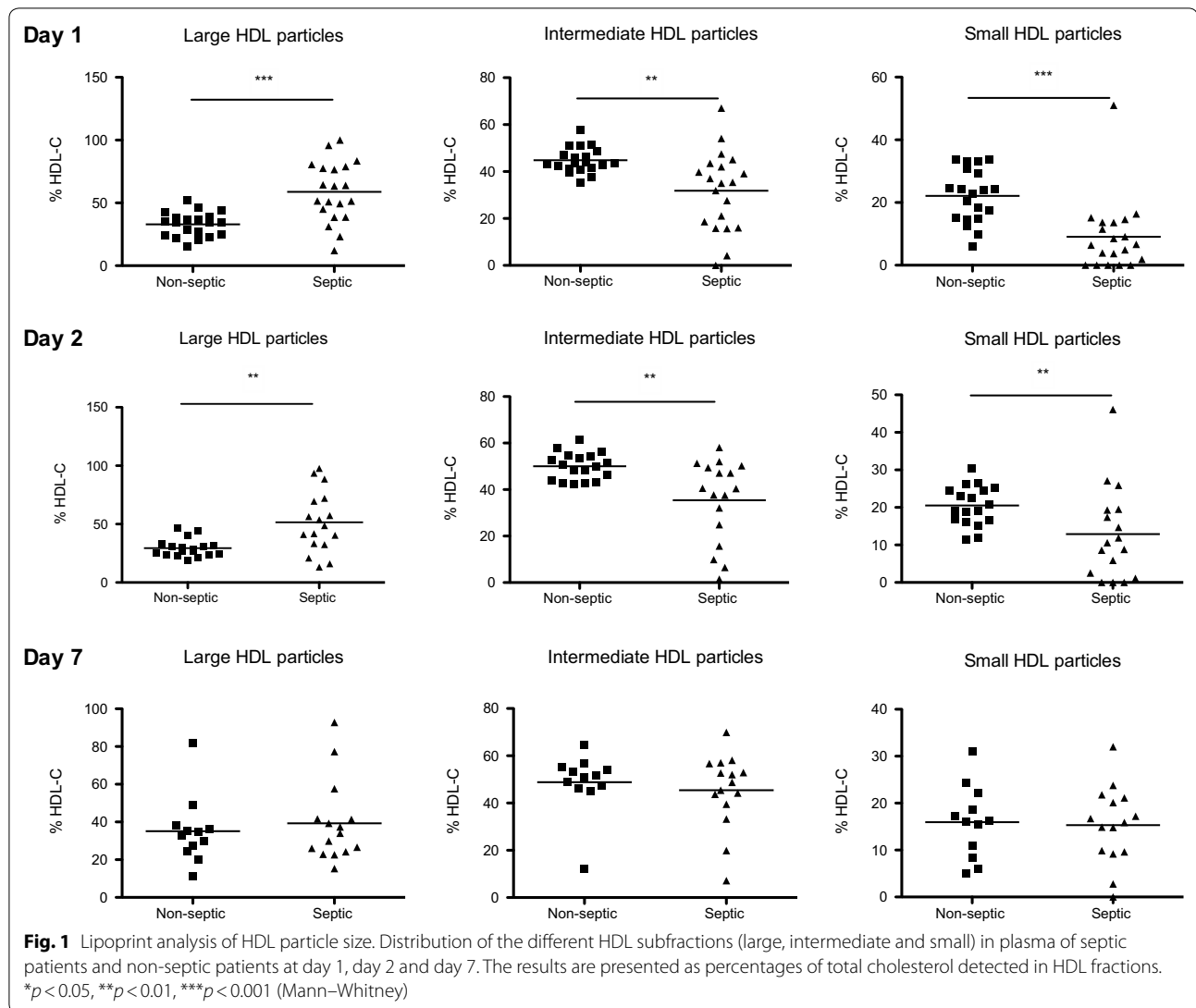
patients, we did not find any correlation between HDL size at day 1, 2 or 7 and patient outcome (mortality or length of stay in ICU) in either septic or control patients. Interestingly, there was a significant positive correlation between the percentage of large particles at day 1 and LBP concentration ( $r=0.39$ ,  $p=0.012$ ) and a significant negative correlation between percentage of small particles at day 1 and LBP concentration ( $r=-0.5$ ,  $p=0.001$ ) (Additional File 2: Fig. S2). No such correlation between particles size and LBP concentration was found at day 2 and 7.

## Discussion

In the present study, we have compared a group of septic shock patients to a control group consisting of patients with a systemic inflammatory response syndrome having suffered traumatic brain injury or multiple traumas,

intracerebral hemorrhage or acute severe bleeding. These two groups are comparable in terms of SAPSII. We have shown that at admission to ICU, HDL-C concentrations were lower and HDL particles were larger in septic versus non-septic patients. This point is of interest since small HDLs are usually considered as functional particles; in sepsis, there is not only a shift toward large non-functional HDLs but also a marked decrease in the concentration of these lipoproteins (HDL cholesterol).

We show that LBP, an acute phase protein predominantly synthesized by the liver in response to gram-negative bacteria [26], is significantly higher in septic versus non-septic patients at 24 and 48 h after admission. The higher cell-free DNA concentration in plasma attested the increased cell death in septic conditions. The release of extracellular DNA is a well-known active phenomenon for neutrophils that are over-stimulated (producing



Neutrophil Extracellular Traps, NETs), in particular with LPS [25, 27]. In our conditions, it cannot be excluded that cells other than neutrophils may contribute to the increased cf-DNA concentration in septic patients. Neutrophils isolated from septic patients have been reported to be less prone to release DNA than those from non-septic subjects; this was paralleled by an increased NET concentration in the septic group [28], suggesting that these cells have already been activated and have subsequently released cf-DNA in plasma.

#### Lipid profile: HDL particle size in septic versus non-septic and septic patients

By comparing septic shock patients to control ICU patients of similar severity, we show that the lipid profile is profoundly modified under septic conditions. Whereas both LDL-C and HDL-C were lower in septic patients,

triglyceride levels were not significantly different between the two groups, albeit slightly higher in septic patients at days 2 and 7. Numerous studies have reported that the serum lipid profile is modified in septic relative to non-septic patients (for review, see [29]). These changes were documented more than 30 years ago [30]. In our study, it is unlikely that lipid changes are due to beta-blockers or angiotensin converting enzyme inhibitors since these drugs do not significantly modify HDL levels. Also, no differences in these treatments were observed between groups (data not shown). However, in a recent work by Khara et al., a 12-month rosuvastatin treatment (20 mg/day) did not change the cholesterol efflux capacity of HDLs, but led to an increase in HDL cholesterol (+7.7%), apoA-I (+4.3%), and HDL particle number (+5.2%) [31]. In our cohort of patients, no differences were observed regarding statin medication between the two groups.

To our knowledge, this is the first demonstration that septic shock patients present a shift of HDL size from small to large particles compared to non-septic patients. In accordance with our results, De la Llera-Moya et al. [32] reported that LPS-induced endotoxemia in healthy volunteers led to a depletion of pre-beta1a and small- and medium-sized HDL particles, determined by 2D electrophoresis and nuclear magnetic resonance. Interestingly, small HDL particles were shown to be more antioxidant and more anti-inflammatory in cardiovascular disease [33], but large HDL particles as determined by Lipoprint technology appear to be more associated with a reduced risk of coronary artery disease [17, 18].

#### **HDLs: therapeutic option or surrogate marker?**

Globally, HDL particles exert a variety of protective effects on endothelial cells [33] that may modulate the physiological response under inflammatory conditions [34]. For example, HDLs have been shown to modulate vascular cell activation [13, 35] and endothelial expression of adhesion molecules [36] that may in turn reduce leukocyte extravasation. In addition, HDLs have been reported to interact with LPS and to facilitate its clearance by different organs [37]. However, different therapeutic strategies aiming at inhibiting LPS binding to TLR4 failed to improve the outcome of severe sepsis patients (no reduction in 28-day and 1-year all-cause mortality) [38]. HDLs, in addition to their LPS-scavenging capacity, may provide a more global endothelial protection and leukocyte pacification that may account for their protective role under inflammatory conditions. Barlage et al. suggested that the beneficial effects of HDLs on gram-positive infections may be due to other anti-inflammatory properties, including the modulation of neutrophil activation [22]. HDLs could also provide a protective effect in sepsis due to their antioxidant capacity. The infusion of reconstituted HDLs (that are considered to be small HDL particles) has been shown to modulate inflammatory parameters in different animal or human settings of endotoxemia [36, 39, 40]. Specifically in rodent models of sepsis, infusion of reconstituted HDLs or mimetic peptides improved survival [36, 41–43].

Moreover, because sepsis still remains an important cause of mortality and morbidity, early biomarkers could be useful to establish a diagnosis of sepsis and also to indicate its severity. To date, there is no biomarker that fulfills these objectives in terms of sensitivity and specificity [4]. The use of HDL concentration, size and/or functionality may thus represent an early and sensitive biomarker of sepsis, low levels being associated with severity and poor outcome. Interestingly, a recent study has shown that variations in genes involved in HDL metabolism could contribute to changes in HDL-C level;

a rare missense variant in CETP (rs1800777-A) was thus associated with significant reductions in HDL-C concentration during sepsis [44]. Carriers of the A allele had an increased mortality and morbidity compared to non-carriers.

#### **Some hypotheses concerning the mechanistic basis of our findings**

- First, the interaction between HDL particles and bacterial components (LPS or LTA) could produce changes in HDL size and potential functions.
- Second, septic conditions and especially a procoagulant state could lead to the aggregation of HDL particles that could participate in increasing HDL size according to the Lipoprint technology.
- Third, sepsis impairs the capacity of HDL to induce cellular cholesterol efflux. ABCA-1 dysfunction could lead to a decrease in the synthesis of small pre- $\beta$  HDL. Moreover, the SRB-1 depletion observed in case of inflammatory condition such as sepsis could also participate in increasing the proportion of large HDL-2 and HDL-3 proportion.
- Lastly, the septic condition increases HDL-associated Serum Amyloid A (SAA). HDL size could be impacted by this association.

#### **Our study has several limitations**

- First, this is a monocentric study with a small population size. However, with only 20 patients per group, we have found a significant difference in HDL particle size between the two groups.
- Second, our analysis was performed using only one electrophoresis system (lipoprint). Other techniques such as nuclear magnetic resonance should also be performed.
- Third, more patients received norepinephrine in septic versus the control group. Norepinephrine stimulates the expression of lipoprotein lipase, which exerts an important role in the metabolism of lipids by hydrolyzing triglycerides contained in chylomicrons and VLDL. Its overexpression may participate in lipid profile modifications under septic conditions.
- Lastly, we did not show in this study any mechanistic pathway explaining the shift toward the large size.

#### **Conclusion**

Our study confirms that HDL-C concentration is very low in septic relative to non-septic patients admitted to our ICU and demonstrates for the first time that HDL

particles are larger under septic conditions. Further studies should be conducted in order to understand the mechanisms of this shift. According to numerous experimental studies [36, 42, 43, 45, 46], HDL supplementation may represent a potential therapy for septic patients. However, additional evidence should be provided in animal models, particularly on hard endpoints such as mortality in order to translate HDL therapy into clinical practice.

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Cytokine concentrations at day 1. IL-1b, IL-6 and IL-8 concentrations between septic and non-septic patients at day 1. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  (Mann–Whitney).

**Additional file 2: Figure S2.** Correlation between the percentage of large and small HDL particles and LBP concentration at day 1.

## Abbreviations

AIDS: acquired immune deficiency syndrome; HDL: high-density lipoprotein; ICU: intensive care unit; IL-1b: interleukin 1b; IL-6: interleukin 6; IL-8: interleukin 8; LBP: lipopolysaccharide; LDL: low-density lipoprotein; NET: neutrophil extracellular traps; NO: nitric oxide; PAF-AH: platelet-activating factor acetylhydrolase; PON1: paraoxonase; TLR-4: toll-like receptor 4; TNF-alpha: tumor necrosis factor-alpha; SAPS II: simplified acute physiology score II; SAA: serum A amyloid; SOFA: sequential organ failure assessment.

## Acknowledgements

The authors thank Dr Mary Osborne-Pellegrin for help in editing the manuscript.

## Authors' contributions

DD and ST designed the study, performed the experimental work, participated in data acquisition, performed the statistical analysis, the interpretation of the results and drafted the manuscript. OM designed the study, performed the experimental work, participated in data acquisition, performed statistical analysis, interpreted the results, supervised the study and drafted the manuscript. SD, JYS, JP performed the experimental work and participated in the interpretation of the results. CG, NZ, HA, SA, ED participated in data acquisition. JD and PM participated in the study design and the interpretation of the results. All authors have read and approved the final manuscript.

## Funding

This work was supported by European Regional Development Funds RE0001897 (EU-Région Réunion-French State national counterpart).

## Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Ethics approval and consent to participate

This study was approved by our local ethics committee (Comité de Protection des Personnes de l'Université Paris VII no SC 13-026), which waived the need for written informed consent because of the observational nature of the study.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Author details

<sup>1</sup> INSERM, UMR 1188 Diabète athérothrombose Réunion Océan Indien (DéTROI), Université de La Réunion, 2 Rue Maxime Rivière, 97491 Sainte

Clotilde, La Réunion, France. <sup>2</sup> AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, CHU Bichat-Claude Bernard, 46 Rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. <sup>3</sup> Inserm U1148, Laboratory for Vascular, Translational Science Bichat Hospital, 46 Rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. <sup>4</sup> AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Université Paris-Sud, Hôpital de Bicêtre, 78 Rue du Général Leclerc, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>5</sup> Laboratoire d'étude de la Microcirculation, «Bio-CANVAS: Biomarkers in CardioNeuroVascular DISEASES» UMR5 942, Paris, France. <sup>6</sup> UMR1137 IAME, Inserm, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Université Paris Diderot and AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France. <sup>7</sup> Inserm UMR1152, Physiopathologie et Epidémiologie des Maladies Respiratoires, Paris, France. <sup>8</sup> CHU de La Réunion, Saint-Denis, France. <sup>9</sup> INSERM U1188 Diabète athérothrombose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROI), Université de La Réunion au CYROI, 2, Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France.

Received: 26 February 2019 Accepted: 30 May 2019

Published online: 13 June 2019

## References

- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Crit Care Med*. 2017;45(3):486–552.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *Lancet Lond Engl*. 2005;365(9453):63–78.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–10.
- Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care Lond Engl*. 2010;14(1):R15.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(21):2063.
- Hoese LM, Gao H, Ward PA. New insights into cellular mechanisms during sepsis. *Immunol Res*. 2006;34(2):133–41.
- Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36(8):1286–98.
- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2002;161(1):1–16.
- Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, De Backer G, Jousilahti P, Keil U, Thomsen T, et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis*. 2009;206(2):611–6.
- Mineo C, Shaul PW. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13(6):226–31.
- Lerch PG, Spycher MO, Doran JE. Reconstituted high density lipoprotein (rHDL) modulates platelet activity in vitro and ex vivo. *Thromb Haemost*. 1998;80(2):316–20.
- Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. New function for high density lipoproteins. Isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma. *J Clin Invest*. 1981;67(3):827–37.
- Murch O, Collin M, Hinds CJ, Thiemermann C. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Intensive Care Med*. 2007;33(1):13–24.
- Murphy AJ, Woollard KJ, Suhartoyo A, Storzaker RA, Shaw J, Sviridov D, et al. Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in in vitro and in vivo models of inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(6):1333–41.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med*. 2002;30(5 Suppl):S294–301.
- El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Després J-P, Hovingh GK, Stroes ESG, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med*. 2009;150(2):84–93.
- Gao F, Ren Y-J, Shen X-Y, Bian Y-F, Xiao C-S, Li H. Correlation between the high density lipoprotein and its subtypes in coronary heart disease. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2016;38(5):1906–14.

18. Li J-J, Zhang Y, Li S, Cui C-J, Zhu C-G, Guo Y-L, et al. Large HDL subfraction but not HDL-C is closely linked with risk factors, coronary severity and outcomes in a cohort of nontreated patients with stable coronary artery disease: a prospective observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(4):e2600.
19. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31(5):1359–66.
20. Tanaka S, Labreuche J, Drumetz E, Harrois A, Hamada S, Vigué B, et al. Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit. *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):60.
21. Chenaud C, Merlani PG, Roux-Lombard P, Burger D, Harbarth S, Luyasu S, et al. Low apolipoprotein A-I level at intensive care unit admission and systemic inflammatory response syndrome exacerbation. *Crit Care Med*. 2004;32(3):632–7.
22. Barlage S, Gnewuch C, Liebisch G, Wolf Z, Audebert FX, Gluck T, Frohlich D, Kramer BK, Rothe G, Schmitz G. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med*. 2009;35(11):1877–85.
23. Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, Yang PC. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med*. 2005;33(8):1688–93.
24. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APHA/ASPC/NLA/PCNA guideline on the management of blood cholesterol: a report of the american college of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2018; <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.11.003>.
25. Delbosc S, Alsac J-M, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, et al. *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18679.
26. Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J Biol Chem*. 1988;263(27):13479–81.
27. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(8):577–82.
28. Hashiba M, Huq A, Tomino A, Hirakawa A, Hattori T, Miyabe H, et al. Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *J Surg Res*. 2015;194(1):248–54.
29. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in infectious diseases and sepsis. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:483–508.
30. Alvarez C, Ramos A. Lipids, lipoproteins, and apoproteins in serum during infection. *Clin Chem*. 1986;32(1 Pt 1):142–5.
31. Khera AV, Everett BM, Caulfield MP, Hantash FM, Wohlgenuth J, Ridker PM, et al. Lipoprotein(a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *Circulation*. 2014;129(6):635–42.
32. de la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, Byrne M, Joshi MR, Nguyen V, et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis*. 2012;222(2):390–4.
33. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, et al. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):493–511.
34. Trinder M, Boyd JH, Brunham LR. Molecular regulation of plasma lipid levels during systemic inflammation and sepsis. *Curr Opin Lipidol*. 2019;30:108.
35. Ma J, Dempsey AA, Stamatou D, Marshall KW, Liew C-C. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects. *Atherosclerosis*. 2007;191(1):63–72.
36. McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, Cuzzocrea S, Mota-Filipe H, Hinds CJ, Miller NE, Thiemermann C. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock*. 2003;20(6):551–7.
37. Freudenberg MA, Bøg-Hansen TC, Back U, Galanos C. Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats. *Infect Immun*. 1980;28(2):373–80.
38. Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*. 2013;309(11):1154–62.
39. Pajkrt D, Doran JE, Koster F, Lerch PG, Arnet B, van der Poll T, et al. Anti-inflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med*. 1996;184(5):1601–8.
40. Casas AT, Hubsch AP, Doran JE. Effects of reconstituted high-density lipoprotein in persistent gram-negative bacteremia. *Am Surg*. 1996;62(5):350–5.
41. Zhang X, Wang L, Chen B. Recombinant HDL (Milano) protects endotoxin-challenged rats from multiple organ injury and dysfunction. *Biol Chem*. 2015;396(1):53–60.
42. Dai L, Datta G, Zhang Z, Gupta H, Patel R, Honavar J, et al. The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J Lipid Res*. 2010;51(9):2695–705.
43. Gupta H, Dai L, Datta G, Garber DW, Grenett H, Li Y, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by an apolipoprotein A-I mimetic peptide. *Circ Res*. 2005;97(3):236–43.
44. Trinder M, Genga KR, Kong HJ, Blauw LL, Lo C, Li X, et al. Cholesteryl ester transfer protein influences high-density lipoprotein levels and survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199(7):854–62.
45. Datta G, Gupta H, Zhang Z, Mayakonda P, Anantharamaiah GM, White CR. HDL mimetic peptide administration improves left ventricular filling and cardiac output in lipopolysaccharide-treated rats. *J Clin Exp Cardiol*. 2011;2:172.
46. Moreira RS, Irigoyen M, Sanches TR, Volpini RA, Camara NOS, Malheiros DM, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F attenuates kidney injury, heart injury, and endothelial dysfunction in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307(5):R514–24.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:**

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

1  
2 **Reconstituted High-Density Lipoprotein therapy improves survival**  
3 **in mouse models of sepsis**

4  
5 Sébastien, Tanaka MD, MSc<sup>1,2</sup>; Claire, Genève MD, MSc<sup>2,3</sup>; Nathalie, Zappella MD, MSc<sup>2,3</sup>;  
6 Jennyfer, Yong-Sang PhD<sup>1</sup>, Cynthia, Planesse MSc<sup>1</sup> ; Liliane, Louedec BscTech<sup>3</sup> ; Wildriss,  
7 Viranaïcken PhD<sup>4</sup> ; Matthieu Bringart, BscTech<sup>1</sup>; Philippe, Montravers MD, PhD<sup>2,5</sup>; Erick,  
8 Denamur MD, PhD<sup>6</sup>; Jacques, Duranteau MD, PhD<sup>7,8</sup>; David, Couret, MD, PhD<sup>1,9</sup>, Olivier,  
9 Meilhac PhD<sup>1,9</sup>

10 <sup>1</sup> Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan  
11 Indien (DÉTROU), Plateforme CYROI, Saint-Denis de La Réunion, France.

12 <sup>2</sup>AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, CHU Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

13 <sup>3</sup> Inserm UMR1148, Laboratory for Vascular Translational Science Bichat Hospital, Paris  
14 France.

15 <sup>4</sup> Université de La Réunion, INSERM, UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249 UMR PIMIT,  
16 Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Plateforme CYROI, 2, Saint-Denis de La  
17 Réunion, France.

18 <sup>5</sup> Inserm UMR1152. Physiopathologie et Epidémiologie des Maladies Respiratoires. Paris,  
19 France.

20 <sup>6</sup> Inserm UMR1137. Infection, Antimicrobiens, Modélisation, Evolution. Paris, France.

21 <sup>7</sup> AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Université  
22 Paris-Sud, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

23 <sup>8</sup> Laboratoire d'étude de la Microcirculation. « Bio-CANVAS: biomarkers in  
24 CardioNeuroVascular DISEASES » UMRS 942, Paris, France.

25 <sup>9</sup> CHU de La Réunion, France.

26  
27  
28 Author Information :

29 - **Dr Sébastien Tanaka**, MD-MSc: Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète  
30 athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROU), Saint-Denis de La Réunion, France. AP-  
31 HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, CHU Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

32 - **Dr Claire Genève**, MD-MSc : AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, CHU Bichat-  
33 Claude Bernard, Paris, France. INSERM UMR1148, Laboratory for Vascular Translational  
34 Science Bichat Hospital, Paris France.

35 - **Dr Nathalie Zappella**, MD-MSc: AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, CHU Bichat-  
36 Claude Bernard, Paris, France. INSERM UMR1148, Laboratory for Vascular Translational  
37 Science Bichat Hospital, Paris France.

38 - **Dr Jennyfer Yong-Sang**, PhD: Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète  
39 athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France.

40 - **Miss Cynthia Planesse**, MSc : Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète  
41 athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France.

42 - **Miss Liliane Louedec**, BscTech: INSERM UMR1148, Laboratory for Vascular  
43 Translational Science Bichat Hospital, Paris France.

44 - **Dr Wildriss Viranaïcken**, PhD ; Université de La Réunion, INSERM, UMR 1187, CNRS  
45 9192, IRD 249 UMR PIMIT, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Plateforme  
46 CYROI, 2, Saint-Denis de La Réunion, France.

47 - **Mr Matthieu Bringart**, Bsc ; Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète  
48 athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France.

49 - **Pr Philippe Montravers**, MD-PhD : AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, CHU  
50 Bichat-Claude Bernard, Paris, France. INSERM UMR1152. Physiopathologie et  
51 Epidémiologie des Maladies Respiratoires. Paris, France.

52 - **Pr Erick Denamur**, MD-PhD: Inserm UMR1137. Infection, Antimicrobiens, Modélisation,  
53 Evolution. Paris, France.

54 - **Pr Jacques Duranteau**, MD-PhD: AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, Hôpitaux  
55 Universitaires Paris-Sud, Université Paris-Sud, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre,  
56 France. Laboratoire d'étude de la Microcirculation. « Bio-CANVAS: biomarkers in  
57 CardioNeuroVascular DISEASES » UMRS 942, Paris, France.

58 - **Dr David Couret**, MD-PhD: Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète  
59 athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France. CHU  
60 de La Réunion, France.

61 - **Dr Olivier Meilhac**, PhD : Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète  
62 athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France. CHU  
63 de La Réunion, France.

64

65

66 **Corresponding Author** : Dr Olivier Meilhac

67 - Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan

68 Indien (DÉTROIT), Saint-Denis de La Réunion, France. Phone: +262262938811

69 email: olivier.meilhac@inserm.fr

70

71 **Acknowledgments** : We thank :

72 - Dr Devy DIALLO and Dr Sandrine DELBOSC (INSERM UMR 1188, Paris, France) for

73 their contributions. They performed Plasma cell-free DNA measurement and RNA isolation

74 and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction.

75 - Pr Dan LONGROIS (INSERM UMR 1188, Paris, France and AP-HP, Service d'Anesthésie-

76 Réanimation, CHU Bichat-Claude Bernard, Paris, France) and Dr Jean-Baptiste MICHEL

77 (INSERM UMR 1188, Paris, France) for their contribution in study conception and design.

78 - Dr Giuseppina CALIGIURI (INSERM UMR 1188, Paris, France) who performed cytokine

79 and endothelial marker measurements.

80

81 **Word and Element Count:**

82 Abstract : 289 words ; Introduction : 399 words ; Discussion section : 1451 words

83 Number of figures : 9 ; Number of tables : 0 ; Number of Digital Files : 6 supplemental

84 figures and one supplemental digital content.

85

86

87 **Abbreviated Title (Running Head):** Protective effects of High-Density Lipoprotein

88

89

90 **Funding:** This work was supported by Fondation de France, ANR JCJC 1105 and the BIIOST

91 Federation from the University of Reunion Island. ST was recipient of a research grant from

92 the « Société française d'Anesthésie-Réanimation (SFAR)-Société de Réanimation de Langue

93 Française (SRLF)-Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) ». JYS



94 received a research grant from « Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)». CG received  
95 a research grant from « Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP) ».

96

97 **Competing interests:** the authors declare no competing interests

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119 **Abstract**

120

121 **Background:** High-density-lipoproteins (HDLs) exert pleiotropic protective effects including  
122 anti-inflammatory, anti-apoptotic and lipopolysaccharide (LPS) neutralizing properties. The  
123 aim of the present study was to assess the effects of reconstituted HDL particles (CSL111)  
124 intravenous injection in different mouse models of sepsis.

125 **Methods:** Prospective experimental study in an university hospital-based research  
126 laboratory. 10-week old C57BL/6 mice were subjected to sepsis by cecal ligation and  
127 puncture (CLP), intraperitoneal (IP) injection of *Escherichia coli* or bacterial pneumonia  
128 (*Pseudomonas aeruginosa*).

129 **Results:** Comparing with saline, CSL111 infusion improved survival in both CLP and IP  
130 models of sepsis (81% of survival rate versus 38% in CLP,  $p=0.011$ ,  $n=16$  mice/group ; 40%  
131 versus 0% in IP,  $p=0.011$ ,  $n=10$  mice/group). Cell free-DNA concentration was lower in  
132 CSL111 groups relative to saline (68 [24-123] pg/ml versus 351 [333-683] pg/ml,  $p<0.001$ ).  
133 Mice treated with CSL111 also presented a decrease in bacterial count at 24 hours after the  
134 CLP both in plasma (200 [28-2302] vs 2500 [953-3636] CFU/10 $\mu$ L of blood in CSL111 vs  
135 saline groups,  $p=0.021$ ,  $n=18$  mice/group) and in the liver (1359 [360-1648] vs 1808 [1464-  
136 2720] CFU/10 $\mu$ L in CSL111 vs saline groups;  $p=0.031$ ,  $n=9$  mice/group). Histologic  
137 evaluation showed an increase of alveolar destruction, associated with infiltration by  
138 inflammatory CD68-positive cells in the saline- vs CSL111-injected groups. (CD68+/total  
139 cells ratio: saline: 0.24 [0.22-0.27] ; CSL111: 0.07 [0.01-0.09] ; sham : 0.02 [0.00-0.04],  
140  $p<0.0001$ ). CSL111 injection also reduced inflammatory cell infiltration as well bacterial  
141 proliferation in the *Pseudomonas aeruginosa* model of pulmonary sepsis.

142 **Conclusions:** CSL111 HDL infusion improved survival in experimental models of sepsis.  
143 Moreover, CSL111 injection led to a reduced inflammation in both plasma and lung. These

144 results suggest that HDLs may play a protective role in sepsis and reinforce the necessity to  
145 explore the therapeutic potential of HDLs in septic conditions.

146  
147

148

## 149 **Introduction**

150 Sepsis remains a major cause of mortality in intensive care unit (ICU), in spite of a  
151 better understanding of the pathophysiology and the development of improved supportive  
152 treatments, antibiotic therapy and surgical techniques (1–4).

153 High-density lipoproteins (HDLs) are characterized by the association of  
154 apolipoproteins such as ApoA1, phospholipids and cholesterol in its free or esterified form.  
155 Their most described function is to mediate the reverse transport of cholesterol (RCT) from  
156 peripheral tissues back to the liver (5). Many studies have described an inverse association  
157 between HDL concentration and cardiovascular events (6–8). In addition to RCT, HDLs  
158 display pleiotropic properties such as anti-inflammatory, antioxidant, anti-apoptotic, and anti-  
159 thrombotic effects (9–14). Furthermore, HDLs are reported to protect the endothelium via  
160 limiting the expression of adhesion molecules under inflammatory conditions (15) and are  
161 able to neutralize lipopolysaccharides (LPS) (16,17).

162 Previous studies have shown that HDL infusion attenuates organ injury in mouse  
163 models of sepsis, potentially via LPS neutralization (18–20). Recently, Zhang et al. have  
164 reported that the use of ApoA1 mimetic peptide improved the survival of septic rats (20).

165 Several clinical studies have been conducted to assess HDL concentration in septic  
166 conditions (21–25). Van Leeuwen et al. underlined that in septic patients, HDL concentration  
167 rapidly fall and can be reduced to 50% (21). In a previous study, we have demonstrated that  
168 compared to trauma patients, HDL levels were lower in case of sepsis (23). Chien et al. have  
169 shown that low HDL levels at day 1 of severe sepsis were significantly associated with an

170 increased mortality (24). Barlage et al. have also found that in ICU, non-survivor septic  
171 patients had a statistically significant decreased ApoA1 concentration (25). In a recent work  
172 comparing septic versus non-septic patients in ICU, we reported a marked decrease in HDL  
173 concentration and a shift toward large non-functional HDL particles (26).

174         Based on HDL pleiotropic effects previously demonstrated, we hypothesized that  
175 supplementation with functional HDLs in a murine model of sepsis could improve the  
176 survival. Several studies have tested apoA1 mimetic peptides or reconstituted HDLs  
177 administered before LPS-injection or the onset of sepsis. Here we have used rHDL made of  
178 ApoA1 and phosphatidylcholines (CSL111®, Behring, Switzerland), tested previously in a  
179 randomized clinical trial involving post-myocardial infarction patients (27). This is the first  
180 study to test the potential therapeutic effects of HDLs in 3 different models of sepsis, using  
181 rHDL potentially injectable in clinical settings.

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195 **Materials and Methods**

196

197 **Reconstituted HDLs** (CSL111®) were provided by CSL Behring AG, Bern, Switzerland).

198 They consist of Apolipoprotein A-I purified from human plasma combined with soybean  
199 phosphatidylcholines to form discoidal particles similar to native HDLs (28).

200

201 **Animals**

202 10-weeks old C57BL/6 female and male mice weighing 20-25g were used in our study (sex

203 ratio 1:1). All experimentations were performed in accordance with the legislation on the

204 protection of animals and were approved by the ethical committees for animal

205 experimentation, Bichat hospital, INSERM 1148, Paris (authorization 2012-15/698-097) and

206 CYROI n°114 (authorization *14827-2018012212274175 V3 and 20938-2019031114427274*

207 *V7*). Experiment were carried out in animal facility in micro-surgery room.

208

209

210 **Models of sepsis**

211 Animals were anesthetized by 2% isoflurane gas anesthesia and 0.05mg/kg buprenorphine

212 was injected as analgesia.

213

214 **Caecal ligation and puncture (CLP)** was performed as previously described by Rittirsch et

215 al. (29,30). Two hours after the CLP, each animal was blindly administered either CSL111

216 (40 mg apoA1/kg) or saline (see supplemental digital content for details). Computer-based

217 randomization was used to allocate drug regimens to each group, performed by a blinded

218 observer from our laboratory.

219

220

**221 Intraperitoneal injection of bacteria (IP model)**

222 In the second model of sepsis,  $4.10^7$  CFU/ml of *Escherichia coli* (IAI76 strain) were  
223 injected into the intraperitoneal cavity in a volume of 400  $\mu$ L of saline (see supplemental  
224 digital content for details). This model induced a peritonitis characterized by a rapid  
225 intravascular transfer of bacteria (31).

226

**227 Pseudomonas aeruginosa pneumonia model (PA model)**

228 For this third model, a concentration of  $4 \times 10^8$  CFU/ml *Pseudomonas aeruginosa* ATCC  
229 27853 strain were instilled in the mouse trachea (see supplemental digital content for details)  
230 (32).

231

232 After the surgery, post-operative care consisted in mouse hydration by saline subcutaneous  
233 infusion (1.2 ml/100g body weight), and analgesia by subcutaneous buprenorphine (5ng/100g  
234 body weight). Mice were placed in the facedown position in a bedding-free, pre-warmed fresh  
235 cage placed over a heating pad. All mice had free access to water and food.

236

**237 Survival rate**

238 In each group in the two sepsis procedures (CLP and IP), mice were observed every two  
239 hours for 150 hours.

240

**241 Plasma and histological analyses**

242 Twenty-four hours after surgical procedure, the animals were sacrificed, blood,  
243 bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and tissues were collected for analysis (see supplemental  
244 digital content for details). An observer blinded to the experimental conditions performed the

245 histological quantification.

246

247

### 248 **Bacteria <sup>111</sup>Indium labeling**

249 <sup>111</sup>Indium was incubated with bacteria for 45 minutes. Bacteria were then washed with saline  
250 by centrifugation in order to discard free <sup>111</sup>Indium. Labeled-bacteria were injected to the  
251 mouse via the intraperitoneal route. The same protocol was performed in CSL111 and saline  
252 groups. The distribution of radioactive bacteria was achieved by scintigraphy at different  
253 times.

254

### 255 **Statistical analysis**

256 The primary outcome of our study was mortality rate and we defined our secondary outcomes  
257 as all plasma and histological analyses as well as Bacteria <sup>111</sup>Indium labeling.

258 Survival curves according to treatment groups were estimated using the Kaplan-Meier method  
259 and compared using a log rank test. No statistical power calculation was conducted prior to  
260 the study. The sample size for survival study was based on previous studies in the field  
261 (20,33,34). Quantitative variables are expressed as median [interquartile range (IQR)].

262 Because of a non-Gaussian distribution, univariate comparisons were made using Mann-  
263 Whitney U test in case of bivariate comparisons. In case of comparisons between 3 groups  
264 (saline, CSL111 and sham groups), we used a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's  
265 Multiple Comparison test. All analyses were performed at the two-tailed  $\alpha$  level of 0.05 and  
266 data were analyzed using Graph Pad Prism® software.

267

268 **Results**

269 *Effect of intravenous CSL111 injections on survival in the CLP model*

270 In saline-injected mice, CLP resulted in an overall survival of 38% at 36 hours versus 81%  
271 survival rate for CSL111-treated mice (Figure 1A,  $p=0.011$ ,  $n=16$  mice per group). At 110  
272 hours, all saline-injected mice were dead whereas CSL111 treatment significantly improved  
273 survival to 31% (Figure 1B,  $p=0.008$ ). Sham-operated mice ( $n=16$  mice) all survived (not  
274 shown). There were no censored data during the observation period.

275

276 *Effect of intravenous CSL111 supplementation on survival in the IP bacterial injection model*

277 In order to validate the protective effects of HDLs, we tested CSL111 in another model of  
278 sepsis induced by IP-injection of *E. coli*. All saline-injected mice were dead at 40h whereas  
279 CSL111 treatment significantly improved survival to 40% at this time point (Figure 1C,  
280  $p=0.011$ ,  $n=10$  mice per group). Sham-operated mice ( $n=10$  mice) all survived (not shown).  
281 There were no censored data during the observational period.

282

283 *Plasma cell-free DNA (cf-DNA)*

284 We measured cf-DNA as a general marker of apoptosis and necrosis, potentially reflecting  
285 neutrophil activation via production of NETs (neutrophil extracellular traps), at baseline and  
286 after 24h. This variation of cf-DNA concentration ( $\Delta$  DNA, pg/ml) was statistically  
287 significantly lower in CSL111 groups relative to saline-injected mice (figure 2, 68 [24-123]  
288 pg/ml versus 351 [333-683] pg/ml,  $p<0.001$ ). CSL111 group,  $n=8$  mice, saline group,  $n=10$   
289 mice, sham group,  $n=9$  mice.

290

291 *BAL and plasma cytokine levels*



292 CLP markedly induced the production of plasma IL1b, IL10 and TNF-alpha relative to sham  
293 production. There was no statistically significant difference between CSL111 and saline  
294 groups for IL1b, IL10 and TNF-alpha at 24 hours after CLP (Figure 3: IL1b: 0 [0-133] pg/ml  
295 versus 90 [6-825] pg/ml, NS; IL10: 3784 [1078-51292] ng/mL versus 27388 [12817-52383]  
296 ng/ml, NS; TNF- $\alpha$ : 85 [44-266] pg/ml versus 171 [102-346] pg/ml, NS). CSL111 group, n=8  
297 mice, saline group, n=10 mice, sham group, n=8 mice.

298 In the PA model, there was no statistically significant difference between CSL111 and saline  
299 groups for IL6 (plasma: CSL111 : 108 [19-205] pg/mL, saline : 119 [61-5807] pg/mL,  
300 p=0.431 ; BAL : CSL111 : 31 [20-58] pg/mL, saline 37 [24-240] pg/mL, p=0.506. CSL111  
301 group, n=6 mice, saline group n=7 mice.

302

### 303 *Quantification of plasma markers of inflammation and endothelial activation*

304 All plasma markers tested except sVCAM-1 were increased under septic conditions relative to  
305 sham-operated mice. There was no statistically significant difference between CSL111- and  
306 saline-injected groups for sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sMMP-9 and PAI-1 at 24 hours  
307 after CLP (supplemental data, figure S1: sICAM-1: 23[14-37] ng/mL versus 28 [18-43]  
308 ng/mL, NS; sVCAM-1: 2275 [1390-2823] pg/mL versus 2203 [1890-3170] pg/mL, NS; sE-  
309 selectin: 130 [56-252] pg/mL versus 212 [134-262] pg/mL, NS; sMMP-9: 28 [19-54] pg/mL  
310 versus 99 [80-177] pg/mL, NS ; PAI-1: 149 [92-212] ng/mL versus 132 [76-232] ng/mL, NS).  
311 CSL111 group, n=8 mice, saline group, n=10 mice, sham group, n=8 mice.

312

### 313 *Lung mRNA expression of IL6, TNF $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin*

314 CLP induced lung expression of ICAM-1, TNF $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin, as  
315 assessed by RT-PCR. Results are expressed in ratio of mRNA to GAPDH. There was no  
316 difference between CSL111 group and saline group in lung RNA expression of IL6, TNF $\alpha$ ,

317 ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin (supplemental data figure S2, IL6: 2.6 [0.7-2.8] versus 1.0  
318 [0.8-5.1], NS ; TNF $\alpha$ : 1.0 [0.9-1.0] versus 1.1 [1.0-1.1], NS ; ICAM-1: 3.0 [2.4-3.8] versus  
319 6.3 [4.4-8.2], NS ; VCAM-1: 1.0 [0.9-1.0] versus 1.0 [0.9-1.0], NS; E-selectin: 0.6 [0.0-1.0]  
320 versus 1.1 [1.0-2.6], NS). Results are expressed in ratio of mRNA to GAPDH. CSL group,  
321 n=5 mice, saline group, n=5 mice, sham group, n=5 mice.

322

### 323 *Bacteremia*

324 Mice treated with CSL111 have a statistically significant decrease of bacteremia at 24 hours  
325 from the CLP compared to saline-injected mice (200 [28-2302] CFU/10 $\mu$ L of blood in  
326 CSL111 group, 2500 [953-3636] CFU/10 $\mu$ L of blood in saline group, p=0.021). n= 18  
327 mice/group. Sham-operated mice were exempt of blood-borne bacteria.

328

### 329 *Bacterial count in liver, lung, spleen and kidney*

330 CSL111 injection led a statistically significant decrease in bacterial rate in the liver at 24h  
331 from the CLP relative to the saline group (1359 [360-1648] CFU/10 $\mu$ L in CSL111 group,  
332 1808 [1464-2720] CFU/10 $\mu$ L in saline group; p=0.031). No difference between the two  
333 groups was observed in lung, spleen and kidney (lung: 844 [104-1489] CFU/10 $\mu$ L versus 807  
334 [492-3762] CFU/10 $\mu$ L, p=0.489; spleen: 320 [114-568] CFU/10 $\mu$ L versus 247 [53-503]  
335 CFU/10 $\mu$ L, p=0.757; kidney: 308 [137-336] CFU/10 $\mu$ L versus 122 [52-904] CFU/10 $\mu$ L,  
336 p=0.436). n=9 mice/group (Figure 4).

337 In the PA model, CSL111 injection led a decreased bacterial concentration in the liver and in  
338 the lung at 24h from the sepsis relative to the saline group. In the liver:  $8.0 \times 10^7$  [ $6.9 \times 10^7$   
339  $-8.4 \times 10^7$ ] in CSL111 group,  $1.13 \times 10^8$  [ $9.9 \times 10^7 -1.3 \times 10^8$ ] in saline group, p<0.001.  
340 In the lung:  $4.9 \times 10^7$  [ $4.6 \times 10^7 -5.6 \times 10^7$ ] in CSL111 group,  $3.2 \times 10^8$  [ $5.8 \times 10^7 -$

341  $4.2 \times 10^8$ ] in saline group,  $p=0.004$ .  $N= 7$  mice in saline group,  $n=5$  mice in CSL111 group.  
342 Figure 5.

343

344 *Lung histological evaluation and immunodetection of apoA1 and CD68*

345 Hematoxylin and eosin staining showed an increase of alveolar destruction and infiltration by  
346 inflammatory cells in the saline mice group compared to mice treated with CSL111  
347 (cells/total area ratio: 0.191 [0.137-0.196] in the saline group, 0.036 [0.032-0.039] in the  
348 CSL111 group, 0.050 [0.045-0.061] in the sham group,  $p=0.011$ ) ( $n=3$  mice/group, Figure 6).

349 In the CLP model, immunohistological analysis of septic lungs 24 hours after intravenous  
350 injection of CSL111 or saline demonstrates that apoA1 reached and accumulated in  
351 pulmonary tissue in HDL-injected mice, suggesting that HDL particles can locally exert their  
352 protective effects (ApoA1 immunopositive area/cell ratio: 0.49 [0.36-1.11] in HDL-injected  
353 mice versus 0.02 [0.01-0.03] in saline group mice,  $p=0.016$ , figure 7 and S3).

354 Immunodetection of CD68-positive macrophage shows a statistically significant increased  
355 accumulation of these inflammatory cells in septic conditions relative to controls (sham-  
356 operated mice) (CD68 immunopositive area/cells ratio: saline: 0.24 [0.22-0.27] ; CSL111  
357 group : 0.07 [0.01-0.09] ; sham group 0.02 [0.00-0.04],  $p<0.0001$ ). HDL injection markedly  
358 limited the recruitment of macrophages in septic conditions (Figures 8 and S4).

359 In the PA model, hematoxylin and eosin staining showed an increase of alveolar destruction  
360 and infiltration by inflammatory cells in the saline mice group compared to mice treated with  
361 CSL111 and the sham group (cells/total area ratio: 0.042 [0.039-0.047] in the saline group,  
362 0.013 [0.013-0.014] in the CSL111 group, 0.013 [0.009-0.017] in the sham group,  $p<0.001$ )  
363 ( $n=3$  mice/group).

364 In the PA model, CSL111-injected mice presented less CD68-positive cells than in saline  
365 group mice. There was no difference between CSL111 mice and sham (CD68

366 immunopositive area/cells ratio: saline: 0.067 [0.054-0.127]; CSL111 group: 0.030 [0.022-  
367 0.037]; sham group 0.004 [0.003-0.009],  $p < 0.0001$ ,  $n = 3$  mice/group, figure 9.

368

369 *<sup>111</sup>Indium bacterial labeling*

370 Scintigraphy has shown that bacteria have mainly an intraperitoneal localization at 1h after IP  
371 injection. At 2h30, in the group of mice treated with CSL111, bacteria have an epigastria  
372 localisation that could be gall bladder. In the saline-injected group, labeled-bacteria were  
373 essentially localized in intraperitoneal position and in testis. There was no epigastria  
374 accumulation in this group of mice.  $N = 2$  mice/group (supplemental data, figure S5).

375

376

377

378

379

380

381

382

## 383 **Discussion**

384           The main finding of the present study is that injection of reconstituted HDLs (CSL  
385 111) markedly improved survival in three different mouse models of sepsis. At different  
386 experimental time points following caecal ligation and puncture, (36, 40 or 110 hours),  
387 mortality was drastically reduced by more than 30% in CSL 111-injected group as compared  
388 to saline-injected group. These results are in the line with several experimental studies  
389 showing a reduced mortality after injection of either reconstituted HDLs or ApoA1 mimetic  
390 peptides in endotoxemic models (15,19,35). Guo et al. have also shown that ApoA1-KO mice  
391 are more susceptible to CLP-induced death (34). Apo-A1 KO mice exhibited a decreased  
392 plasma LPS neutralization capacity relative to control mice. In this context, our results and the  
393 conclusions of these studies emphasized a major protective role of HDLs during experimental  
394 sepsis. We performed these two models of sepsis (CLP and IP bacterial injection models)  
395 because they are more similar to human sepsis as compared to LPS infusion: LPS injection  
396 appears to be simple and reproducible but probably does not reflect the complex physiological  
397 human response to the bacterial insult. In contrast, in the intraperitoneal bacterial injection  
398 model, the presence of bacteria allows insights into mechanisms of host response to  
399 pathogens. Moreover, CLP model represents a polymicrobial sepsis model and may be similar  
400 to human sepsis progression with similar hemodynamic and metabolic phases (36). We also  
401 performed a third model of sepsis consisting in bacterial pneumonia induced by an intra-  
402 tracheal injection of *Pseudomonas aeruginosa*, in order to test the potential of HDL therapy in  
403 a non-intra-abdominal sepsis model.

404

405           Concerning our histological results, in both peritonitis and pneumonia models, we  
406 showed that mice treated with CSL111 had less lung inflammatory cell infiltration and less  
407 alveolar septal destruction. Our results are in line with McDonald et al. study who found that

408 pretreatment of LPS-rats with rHDLs attenuated intestinal injury by reducing edema, cell  
409 infiltration or destruction of the normal architecture (15). Moreover, we also underline an  
410 interesting anti-inflammatory property of HDL particles. It is clearly established that  
411 macrophage recruitment is associated with inflammation in acute lung injury and acute  
412 respiratory distress syndrome (37). Interestingly, in our study, in both models peritonitis and  
413 pneumonia mice treated with CSL111 had less macrophage infiltration than mice injected  
414 with saline conferring to CSL111 a protective anti-inflammatory effect.

415  
416 This inflammatory state may also be characterized by increased levels of plasma  
417 markers, such as cell-free DNA (cf-DNA). Neutrophil activation by pathogens leads to the  
418 liberation of DNA associated with antimicrobial proteins contained in granules called  
419 neutrophil extracellular traps (NETs) (38). NET production has been highlighted in different  
420 pathologies other than sepsis such as cancer, trauma or myocardial infarction (39,40). DNA  
421 may be released into the circulation from apoptotic and necrotic cells. Apoptosis plays a  
422 major role in the pathophysiological process in sepsis and in particular NETosis, consisting in  
423 the release of neutrophil extracellular traps by activated neutrophils, that participate  
424 significantly in producing cf-DNA. Circulating DNA concentration has been reported to be  
425 increased in the plasma of septic patients (41). Cf-DNA also appears to be a predictor of  
426 outcome in septic shock patients (42–44). Because of the increase of cell death and NETosis  
427 in septic conditions, cf-DNA concentration was higher at admission in ICU nonsurvivor than  
428 in survivors according to Saukkonen et al. In our study, the reduced cf-DNA concentration in  
429 HDL- versus saline-injected mice is probably due to the anti-apoptotic protective effect of  
430 HDL particles, as well as their capacity to limit neutrophil activation.

431

432

433 As expected, TNF- $\alpha$ , IL1b and IL10 levels were increased by the CLP procedure  
434 relative to sham-operated mice. However, in our different models of sepsis, we failed to show  
435 a reduction in cytokine production in HDL-treated mice. Comparing with recent literature in  
436 the field, cytokine expression is time- and model-dependent: rHDL treatment in rats  
437 subjected to endotoxemia did not reduce the serum level increase of TNF- $\alpha$  following LPS  
438 administration (15). Zhang et al. reported a decrease in IL-6 plasma levels 12 hours after CLP  
439 in 4F-treated mice (ApoA1 mimetic peptide), but not at 24h (20). Dai et al. also found  
440 reduced TNF- $\alpha$  levels in 4F-treated mice at 2 hours but not at 6 hours (19). In our study,  
441 cytokine measurement was only performed at 24 hours after the CLP, which may be  
442 inappropriate to show differences in HDL-treated mice.

443 HDLs display a variety of endothelial protective effects (14). In human umbilical vein  
444 endothelial cells stimulated with TNF- $\alpha$  for 4 hours, Cockerill et al. have demonstrated that  
445 pre-incubation with physiological concentration of mature HDLs attenuated the expression of  
446 adhesion molecules such as VCAM-1, ICAM-1 or E-selectin (46). McDonald et al. reported  
447 that rHDL attenuated the upregulation of ICAM-1 and P-selectin observed by  
448 immunohistochemistry in the kidney of rats subjected to a 6-hour endotoxemia (15). In our  
449 work, Il6, TNF- $\alpha$  and VCAM-1 mRNA lung levels were unchanged at 24 hours, by the CLP  
450 procedure, whereas ICAM-1 and E-selectin expression was increased in the lung of septic  
451 mice. Interaction between sepsis and acute respiratory distress syndrome (ARDS) are  
452 complex, involving complement system activation, neutrophil infiltration, vascular  
453 endothelial system damage, activation of coagulation cascades and barrier dysfunction  
454 (47,48). The lung damage occurring during sepsis increases the morbi-mortality; patients with  
455 sepsis-related ARDS have a higher 60-day mortality rate than patients with non-sepsis related  
456 ARDS (49).

457 In addition to their anti-inflammatory potential, HDLs have been reported to bind and  
458 neutralize lipopolysaccharides (50,51). Here, we show that mice treated by CSL111 presented  
459 a statistically significant decrease in bacteremia at 24h from the CLP as compared with saline-  
460 injected mice. Whereas in the pneumonia model we found a decreased of bacterial count in  
461 both liver and lung of HDL-treated mice, in the CLP model, this decreased bacterial tissue  
462 contamination was only statistically significant in the liver. It could be hypothesized that  
463 HDL may bind and improve LPS and/or bacteria clearance via the liver and subsequent bile  
464 excretion. An increased mortality was observed in rats subjected to bile duct ligation in a  
465 model of endotoxemia induced by LPS and prevented by rHDL treatment (52). After labeling  
466 bacteria with <sup>111</sup>In, we show that they were directed to the bile vesicle in rHDL-treated mice.

467

468 We also have demonstrated that ApoA1 is able, after intravenous infusion to reach and  
469 accumulate in the lung. Immunohistological analysis of septic lungs showed an intense  
470 staining for apoA1 pulmonary tissue in HDL-injected mice, suggesting that HDL may exert  
471 their pleiotropic effects (in particular antioxidant and anti-inflammatory). We have previously  
472 reported that HDLs could accumulate in the lung under inflammatory conditions after IV  
473 injection (in a model of pulmonary emphysema) (53). To our knowledge, our study described  
474 for the first time this lung localization in a septic model.

475

476 Our work has several limitations. First, we did not monitor hemodynamic parameters.  
477 Blood gases to collect lactate levels could have been interesting to monitor. Second, tolerance  
478 parameters such as renal or hepatic function were not measured in our study. Third, CSL111  
479 were injected only two hours after the CLP. A later infusion might be of interest in order to  
480 better fit to a potential clinical situation.

481



482 In clinical practice, reconstituted HDL injection has been tested in several clinical  
483 settings including atherosclerosis and type 2 diabetes (28,54–56). The ERASE study  
484 consisting of short-term infusions of CSL-111 reconstituted HDL resulted in no statistically  
485 significant reductions in percentage change in atheroma volume compared with placebo but  
486 allowed a statistically significant improvement in the plaque characterization index and  
487 coronary score on quantitative coronary angiography (27).

488 Concerning clinical research in the sepsis field, to our knowledge, only two studies  
489 have tested the protective effects of reconstituted HDL in human endotoxemia (57,58). In one  
490 of them, reconstituted HDL infusion dramatically reduced the endotoxin-induced  
491 inflammatory response induced in human endotoxemia (57). Moreover, several observational  
492 studies, including ours, conducted in septic patients have shown that HDL concentration is  
493 low and that these HDL particles are potentially dysfunctional (21,23–25).

494 In this context, in acute conditions such as sepsis, HDL supplementation may  
495 represent a new therapeutic approach, due to their potential to limit inflammation, to protect  
496 the endothelial barrier and to improve LPS neutralization.

497  
498 In conclusion, CSL111 High-Density Lipoprotein infusion improved survival in  
499 different mouse models of sepsis. Moreover, in peritonitis and pneumonia models, CSL111  
500 injection led to a reduced inflammation in both plasma and lung. Mice treated with CSL111  
501 presented a statistically significant decrease in bacterial count at 24h after the sepsis in  
502 plasma, liver and lung; and also had less macrophage infiltration in the lung relative to the  
503 saline group conferring to CSL111 a protective anti-inflammatory effect. These results  
504 emphasized the key role for HDLs in LPS/bacteria neutralization and clearance. Further  
505 mechanistic insights are needed before performing a clinical trial using apoA-1-containing  
506 reconstituted HDLs in human sepsis.

507 **References:**

- 508 1. Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical  
509 manifestations. *Crit Care Clin.* 2000 Apr;16(2):179–92.
- 510 2. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A,  
511 Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D,  
512 Beale RJ, Bellingham GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ,  
513 Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM,  
514 Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean  
515 AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett  
516 CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ,  
517 Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ,  
518 Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for  
519 Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med.* 2017 Mar;45(3):486–552.
- 520 3. Polderman KH, Girbes ARJ. Drug intervention trials in sepsis: divergent results.  
521 *Lancet Lond Engl.* 2004 May 22;363(9422):1721–3.
- 522 4. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M,  
523 Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall  
524 JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third  
525 International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016 Feb  
526 23;315(8):801–10.
- 527 5. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J*  
528 *Lipid Res.* 1995 Feb;36(2):211–28.
- 529 6. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs  
530 DR Jr, Banqdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular  
531 disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989 Jan;79(1):8–15.
- 532 7. Emerging Risk Factors Collaboration, Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio  
533 E, Thompson A, White IR, Marcovina SM, Collins R, Thompson SG, Danesh J.  
534 Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular  
535 mortality. *JAMA.* 2009 Jul 22;302(4):412–23.
- 536 8. Jacobs DR, Mebane IL, Bangdiwala SI, Criqui MH, Tyroler HA. High density  
537 lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women:  
538 the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Am J Epidemiol.* 1990  
539 Jan;131(1):32–47.
- 540 9. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early  
541 atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature.* 1991 Sep  
542 19;353(6341):265–7.
- 543 10. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development  
544 of ischaemic heart-disease. *Lancet Lond Engl.* 1975 Jan 4;1(7897):16–9.
- 545 11. Kitamura A, Iso H, Naito Y, Iida M, Konishi M, Folsom AR, Sato S, Kiyama M,  
546 Nakamura M, Sankai T. High-density lipoprotein cholesterol and premature coronary heart  
547 disease in urban Japanese men. *Circulation.* 1994 Jun;89(6):2533–9.
- 548 12. Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic  
549 shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock Augusta Ga.* 2004  
550 Mar;21(3):210–21.
- 551 13. Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schäfers M, Herrgott I, Mersmann J,  
552 Larmann J, Hermann S, Stypmann J, Schober O, Hildebrand R, Schultz R, Heusch G, Haude  
553 M, von Wnuck Lipinski K, Herzog C, Schmitz M, Erbel R, Chun J, Levkau B. High-density  
554 lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against  
555 ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation.* 2006

- 556 Sep 26;114(13):1403–9.
- 557 14. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, Burillo  
558 E, Michel JB, Levoye A, Martin-Ventura JL, Meilhac O. HDL and endothelial protection. *Br*  
559 *J Pharmacol*. 2013 Jun;169(3):493–511.
- 560 15. McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, Cuzzocrea S, Mota-Filipe H, Hinds CJ,  
561 Miller NE, Thiernemann C: Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury  
562 and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock* 2003,  
563 20(6):551-557.
- 564 16. Veszy CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS: Lipopolysaccharide-  
565 binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-  
566 negative bacterial membranes. *Infect Immun* 2000, 68(5):2410-2417.
- 567 17. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD: Lipopolysaccharide  
568 (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of  
569 LPS. *J Exp Med* 1994, 180(3):1025-1035.
- 570 18. Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. In vivo protection against  
571 endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec  
572 15;90(24):12040–4.
- 573 19. Dai L, Datta G, Zhang Z, Gupta H, Patel R, Honavar J, Modi S, Wyss JM,  
574 Palgunachari M, Anantharamaiah GM, White CR: The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F  
575 prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J Lipid Res* 2010, 51(9):2695-2705.
- 576 20. Zhang Z, Datta G, Zhang Y, Miller AP, Mochon P, Chen YF, Chatham J,  
577 Anantharamaiah GM, White CR: Apolipoprotein A-I mimetic peptide treatment inhibits  
578 inflammatory responses and improves survival in septic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*  
579 2009, 297(2):H866-873.
- 580 21. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP:  
581 Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Critical care medicine* 2003,  
582 31(5):1359-1366.
- 583 22. Trinder M, Genga KR, Kong HJ, Blauw LL, Lo C, Li X, Cirstea M, Wang Y, Rensen  
584 PCN, Russell JA, Walley KR, Boyd JH, Bruham LR. Cholesteryl Ester Transfer Protein  
585 Influences High-Density Lipoprotein Levels and Survival in Sepsis. *Am J Respir Crit Care*  
586 *Med*. 2018 Oct 15;
- 587 23. Tanaka S, Labreuche J, Drumez E, Harrois A, Hamada S, Vigué B, Couret D,  
588 Duranteau J, Meilhac O. Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care  
589 unit. *Ann Intensive Care*. 2017 Dec;7(1):60.
- 590 24. Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, Yang PC: Low serum level of high-density lipoprotein  
591 cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Critical care medicine* 2005,  
592 33(8):1688-1693.
- 593 25. Barlage S, Gnewuch C, Liebisch G, Wolf Z, Audebert FX, Gluck T, Frohlich D,  
594 Kramer BK, Rothe G, Schmitz G: Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to  
595 mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care*  
596 *Med* 2009, 35(11):1877-1885.
- 597 26. Tanaka S, Diallo D, Delbosc S, Genève C, Zappella N, Yong-Sang J, Patche J, Harrois  
598 A, Hamada S, Denamur E, Montravers P, Duranteau J, Meilhac O. High-density lipoprotein  
599 (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Ann Intensive Care*.  
600 2019 Jun 13;9(1):68.
- 601 27. Tardif J-C, Grégoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Lespérance J, Heinonen TM, Kouz S,  
602 Berry C, Bassar R, Lavoie MA, Guertin MC, Rodés-Cabau J. Effects of reconstituted high-  
603 density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial.  
604 *JAMA*. 2007 Apr 18;297(15):1675–82.
- 605 28. Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA, Thomas

- 606 WG, Mukhamedova N, de Courten B, Forbes JM, Yap FY, Kaye DM, van Hall G, Febbraio  
607 MA, Kemp BE, Sviridov D, Steinberg GR, Kingwell BA. High-density lipoprotein modulates  
608 glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2009 Apr  
609 21;119(15):2103–11.
- 610 29. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental  
611 sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009;4(1):31–6.
- 612 30. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*  
613 *Augusta Ga*. 1998 Jan;9(1):1–11.
- 614 31. O’Dwyer MJ, Starczewska MH, Schrenzel J, Zacharowski K, Ecker DJ, Sampath R,  
615 Brealey D, Singer M, Libert N, Wilks M, Vincent JL. The detection of microbial DNA but  
616 not cultured bacteria is associated with increased mortality in patients with suspected sepsis—a  
617 prospective multi-centre European observational study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur*  
618 *Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Mar;23(3):208.e1-208.e6.
- 619 32. Sun F, Xiao G, Qu Z. Murine Bronchoalveolar Lavage. *Bio-Protoc*. 2017 May  
620 20;7(10).
- 621 33. Moreira RS, Irigoyen M, Sanches TR, Volpini RA, Camara NOS, Malheiros DM,  
622 Shimizu MH, Seguro AC, Andrade L. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F attenuates  
623 kidney injury, heart injury, and endothelial dysfunction in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr*  
624 *Comp Physiol*. 2014 Sep 1;307(5):R514-524.
- 625 34. Guo L, Ai J, Zheng Z, Howatt DA, Daugherty A, Huang B, Li XA. High density  
626 lipoprotein protects against polymicrobe-induced sepsis in mice. *J Biol Chem*. 2013 Jun  
627 21;288(25):17947–53.
- 628 35. Zhang X, Wang L, Chen B. Recombinant HDL (Milano) protects endotoxin-  
629 challenged rats from multiple organ injury and dysfunction. *Biol Chem* 2015; Jan; 396(1):53-  
630 60.
- 631 36. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit*  
632 *Care Med*. 2004 May;32(5 Suppl):S219-222.
- 633 37. Aggarwal NR, King LS, D’Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate  
634 acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Apr  
635 15;306(8):L709-725.
- 636 38. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs.  
637 *Nat Rev Microbiol*. 2007 Aug;5(8):577–82.
- 638 39. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic  
639 marker in trauma patients. *Clin Chem*. 2000 Mar;46(3):319–23.
- 640 40. Margraf S, Lötters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived  
641 circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic  
642 development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock Augusta Ga*. 2008 Oct;30(4):352–  
643 8.
- 644 41. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and  
645 inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2006 Nov;6(11):813–22.
- 646 42. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettilä V, Varpula M, Karlsson S, Ruokonen E, Pulkki K;  
647 Finnsepsis Study Group. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and  
648 septic shock. *Clin Chem*. 2008 Jun;54(6):1000–7.
- 649 43. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett ED. Plasma DNA concentration  
650 as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care Lond Engl*.  
651 2006;10(2):R60.
- 652 44. Zeerleder S, Zwart B, Wuillemin WA, Aarden LA, Groeneveld ABJ, Caliezi C, van  
653 Nieuwenhuijze ZE, van Mierlo GJ, Eerenberg AJ, Lämmle B, Hack CE. Elevated nucleosome  
654 levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med*. 2003 Jul;31(7):1947–51.
- 655 45. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, Burillo

- 656 E, Michel JB, Levoye A, Martin-Ventura JL, Meilhac O: HDL and endothelial protection.  
657 *British journal of pharmacology* 2013, 169(3):493-511.
- 658 46. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins  
659 inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler*  
660 *Thromb Vasc Biol.* 1995 Nov;15(11):1987-94.
- 661 47. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013 Nov  
662 21;369(21):2063.
- 663 48. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J*  
664 *Clin Invest.* 2012 Aug;122(8):2731-40.
- 665 49. Sheu C-C, Gong MN, Zhai R, Chen F, Bajwa EK, Clardy PF, Gallagher DC,  
666 Thompson BT, Christiani DC. Clinical characteristics and outcomes of sepsis-related vs non-  
667 sepsis-related ARDS. *Chest.* 2010 Sep;138(3):559-67.
- 668 50. Freudenberg MA, Bøg-Hansen TC, Back U, Galanos C. Interaction of  
669 lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats. *Infect Immun.* 1980  
670 May;28(2):373-80.
- 671 51. Gupta H, Dai L, Datta G, Garber DW, Grenett H, Li Y, Mishra V, Palgunachari MN,  
672 Handattu S, Gianturco SH, Bradley WA, Anantharamaiah GM, White CR: Inhibition of  
673 lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by an apolipoprotein AI mimetic peptide.  
674 *Circ Res* 2005, 97(3):236-243.
- 675 52. Sewnath ME, Levels HH, Oude Elferink R, van Noorden CJ, ten Kate FJ, van  
676 Deventer SJ, Gouma DJ. Endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats after  
677 administration of reconstituted high-density lipoprotein. *Hepatol Baltim Md.* 2000  
678 Dec;32(6):1289-99.
- 679 53. Moreno J-A, Ortega-Gomez A, Rubio-Navarro A, Louedec L, Ho-Tin-Noé B,  
680 Caligiuri G, Nicoletti A, Levoye A, Plantier L, Meilhac O. High-density lipoproteins  
681 potentiate  $\alpha$ 1-antitrypsin therapy in elastase-induced pulmonary emphysema. *Am J Respir*  
682 *Cell Mol Biol.* 2014 Oct;51(4):536-49.
- 683 54. Michael Gibson C, Korjian S, Tricoci P, Daaboul Y, Yee M, Jain P, Alexander JH,  
684 Steg PG, Lincoff AM, Kastelein JJ, Mehran R, D'Andrea DM, Deckelbaum LI, Merkely B,  
685 Zarebinski M, Ophuis TO, Harrington RA. Safety and Tolerability of CSL112, a  
686 Reconstituted, Infusible, Plasma-Derived Apolipoprotein A-I, After Acute Myocardial  
687 Infarction: The AEGIS-I Trial (ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes I).  
688 *Circulation.* 2016 Dec 13;134(24):1918-30.
- 689 55. Calkin AC, Drew BG, Ono A, Duffy SJ, Gordon MV, Schoenwaelder SM, Sviridov  
690 D, Cooper ME, Kingwell BA, Jackson SP. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates  
691 platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux.  
692 *Circulation.* 2009 Nov 24;120(21):2095-104.
- 693 56. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM,  
694 Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R.  
695 Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute  
696 coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003 Nov 5;290(17):2292-300.
- 697 57. Pajkrt D, Doran JE, Koster F, Lerch PG, Arnet B, van der Poll T, ten Cate JW, van  
698 Deventer SJ. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human  
699 endotoxemia. *J Exp Med.* 1996 Nov 1;184(5):1601-8.
- 700 58. Pajkrt D, Lerch PG, van der Poll T, Levi M, Illi M, Doran JE, Arnet B, van den Ende  
701 A, ten Cate JW, van Deventer SJ. Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein  
702 on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thromb*  
703 *Haemost.* 1997 Feb;77(2):303-7.
- 704

705 **Figures legends**

706

707 **Figure 1:** Survival rate of mice that underwent CLP at 36 and 150 hours after surgery (A-B)  
 708 or injected with  $4.10^7$  IAI76 *Escherichia coli* at 48 hours (C). N= 16 per group, \*p=0.01,  
 709 \*\*p<0.01 comparing CSL111 vs saline-injected using a log-rank (Mantel-Cox) test.

710

711 **Figure 2:** Cell-free-DNA concentration (pg/ml) in plasma 4 hours before and 24 hours after  
 712 surgery. Saline group, n=10, CSL111 group, n=8, sham group, n=9.

713

714 **Figure 3:** IL1b, IL10 and TNF-alpha concentration in plasma (pg/ml) at 24 hours after CLP.  
 715 Control group, n=10, CSL111 and sham groups, n=8 mice.

716

717 **Figure 4:** Bacterial count (CFU/10µL). n=9 mice/group. Serial dilutions of tissue  
 718 homogenates (liver, lung, spleen, kidney) were performed in saline and then seeded in LB  
 719 Agar culture medium. After a 24h incubation at 37°C, the CFU were counted in order to  
 720 evaluate the bacterial concentration.

721

722 **Figure 5:** *Pseudomonas aeruginosa* bacterial count in liver and lung, 24 hours after  
 723 pneumonia model. n=7 mice in saline group, n=5 in CSL111 group. \*\*p<0.01 , \*\*\*p<0.001.

724

725 **Figure 6:** Histological sections of lung tissue stained with hematoxylin-eosin, the black scale  
 726 bar represents 100 mm. (n=3/group).

727

728 **Figure 7:** Immunodetection of ApoA1 in the lung. Nuclei are stained with DAPI (blue),  
 729 ApoA1 fluorescence appears in green (Alexa 488 secondary antibody). The black scale bar  
 730 represents 100 mm. (n=3/group).

731

732 **Figure 8:** Immunodetection of CD68 in the lung. Nuclei are stained with DAPI (blue), CD68  
 733 fluorescence appears in red (Alexa 594 secondary antibody). The black scale bar represents  
 734 100 mm. (n=3/group).

735

736 **Figure 9:** CD68 positive cells/ total cells ratio in the lung 24 hours after the *Pseudomonas*  
 737 *aeruginosa* pneumonia model. n=3 mice/group. \*p<0.05 , \*\*\*\*p<0.0001.

738

739 **Figure S1:** Plasma concentrations of sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sMMP-9 and sPAI-1  
 740 at 24 hours after CLP. Saline group, n=10, CSL111 and sham groups, n=8.

741

742 **Figure S2:** Lung mRNA expression of IL6, TNF $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin.  
 743 Control group, n=10, CSL111 and sham groups, n=8.

744

745 **Figure S3:** ApoA1 immunodetection/ total cells ratio in the lung 24 hours after CLP.  
 746 n=3/group. \*p<0.05.

747

748 **Figure S4:** CD68 positive cells / total cells ratio in the lung 24 hours after CLP. n=3/group.  
 749 \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001

750

751 **Figure S5:** Scintigraphic analysis of <sup>111</sup>Indium-labelled *E. coli* injected by intraperitoneal (IP)  
 752 route in mice. A-B: Septic mice injected with CSL111; C-D: septic mice injected with saline.  
 753 White arrows indicate epigastria localisation (n=2 /group).

754

755 **Figure S6** : Survival rate of mice at 36 hours after intraperitoneal injection of IAI76  
756 *Escherichia coli* at different concentrations ( $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$  and  $10^8$  CFU/ml).  
757 n=10 mice per group.  
758

759

760

761

762

763

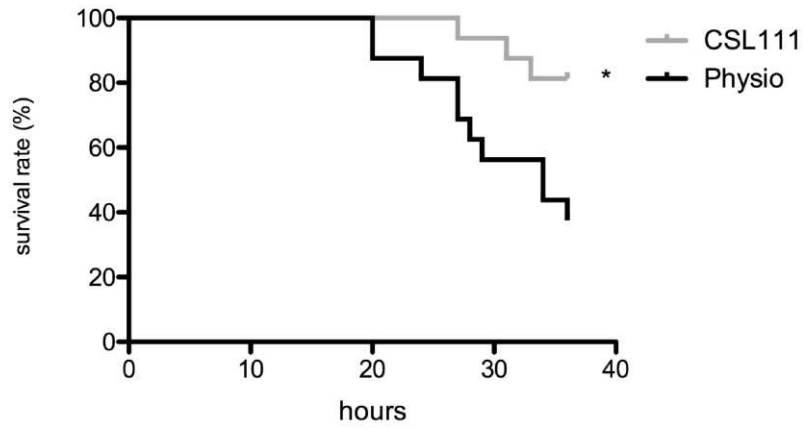
764

765

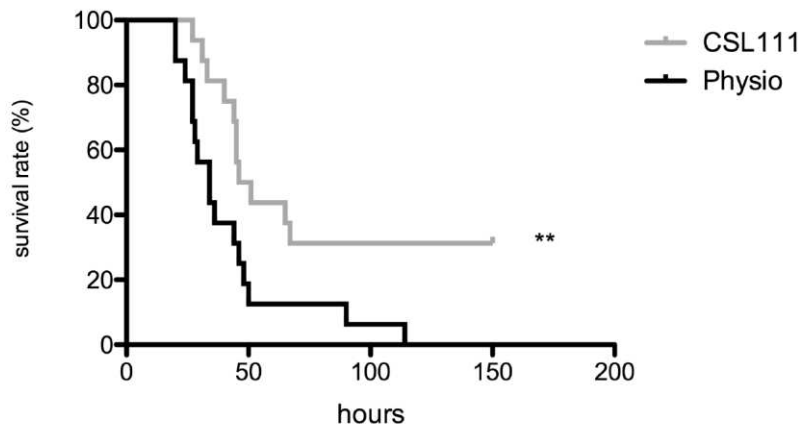
766

767

A



B



C

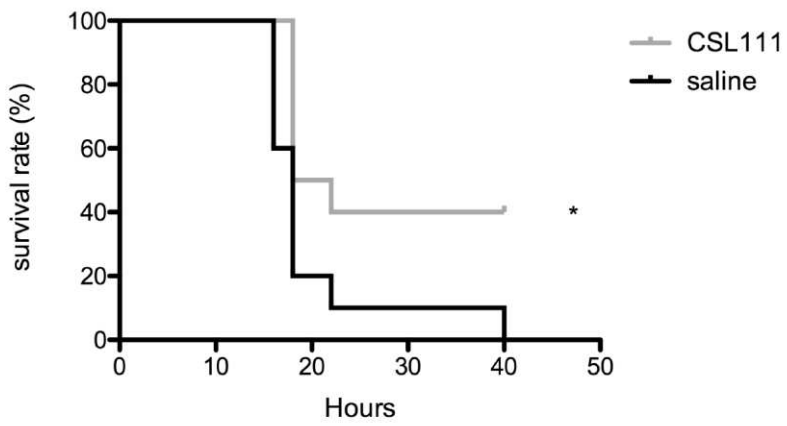


Figure 1



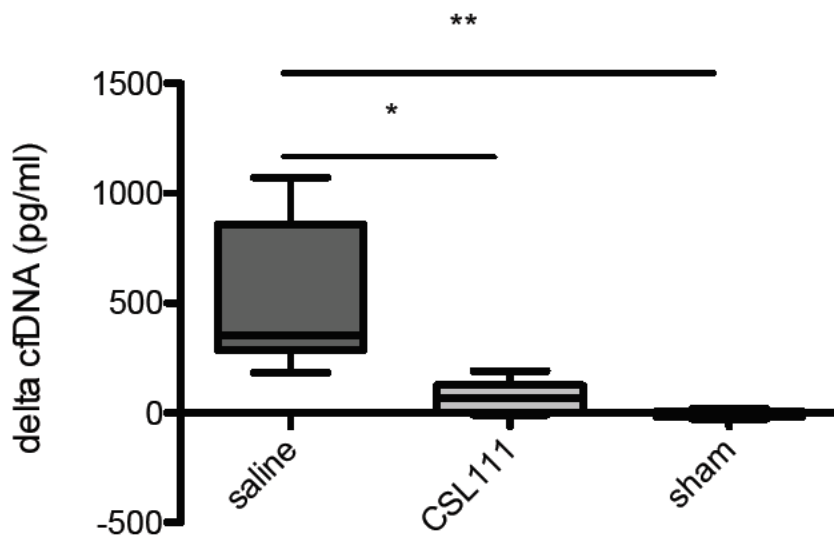


Figure 2

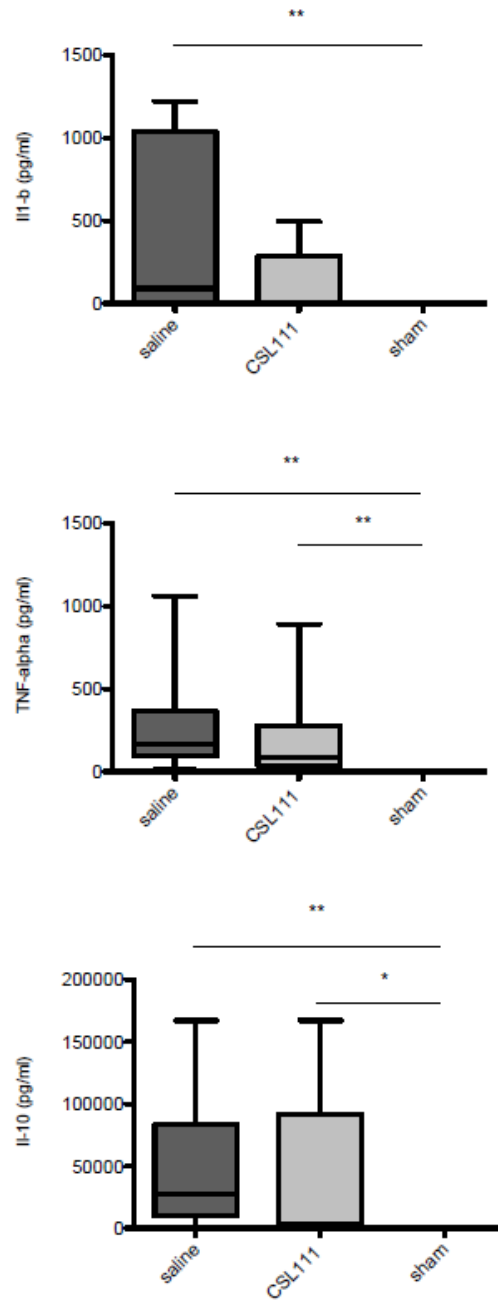


Figure 3

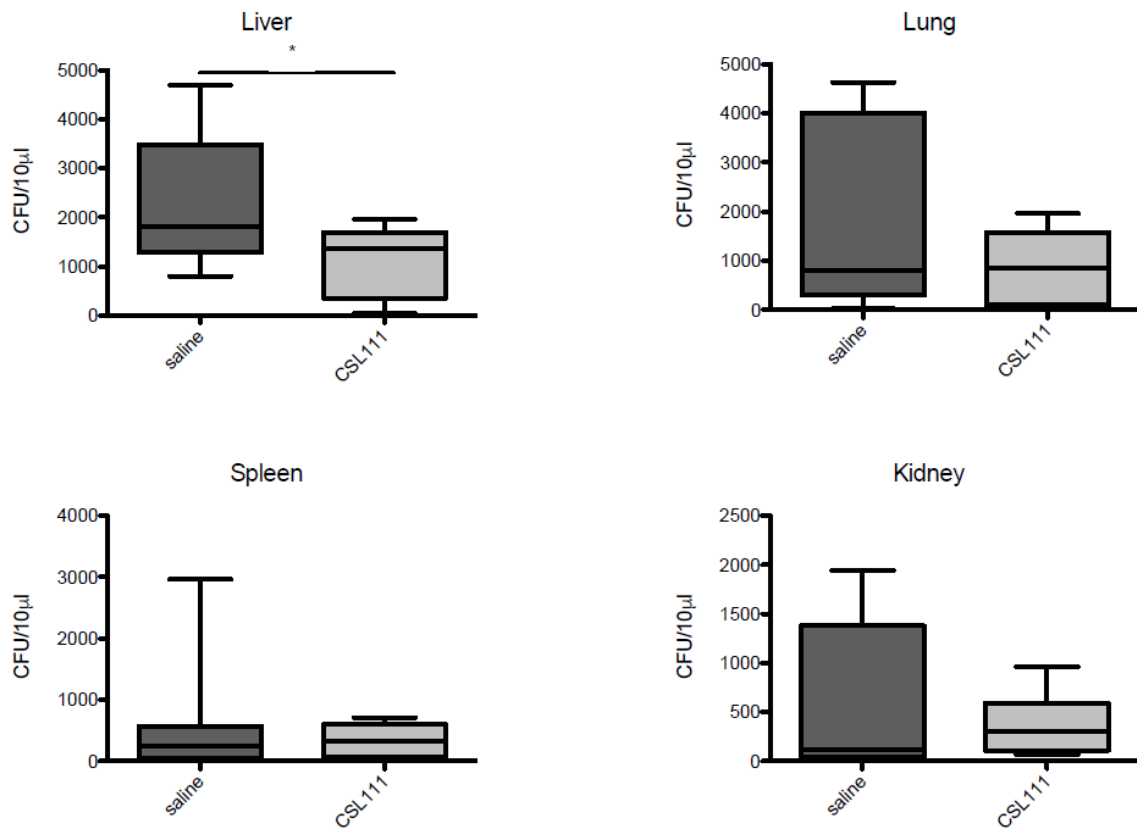


Figure 4

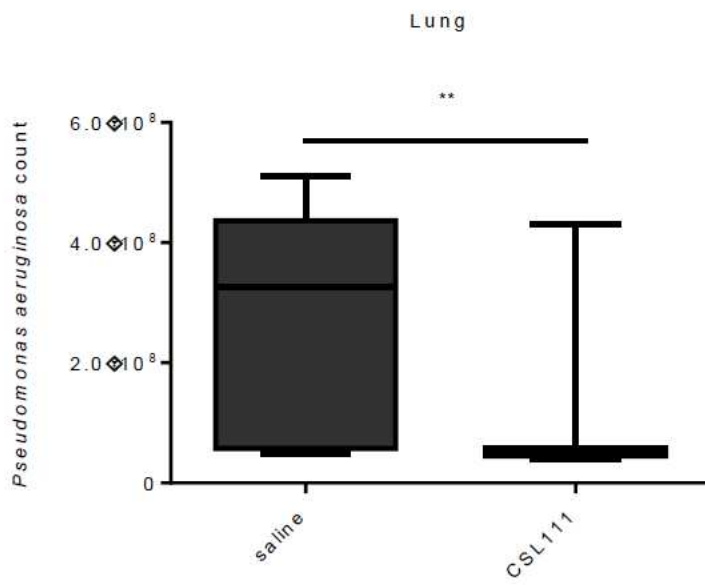
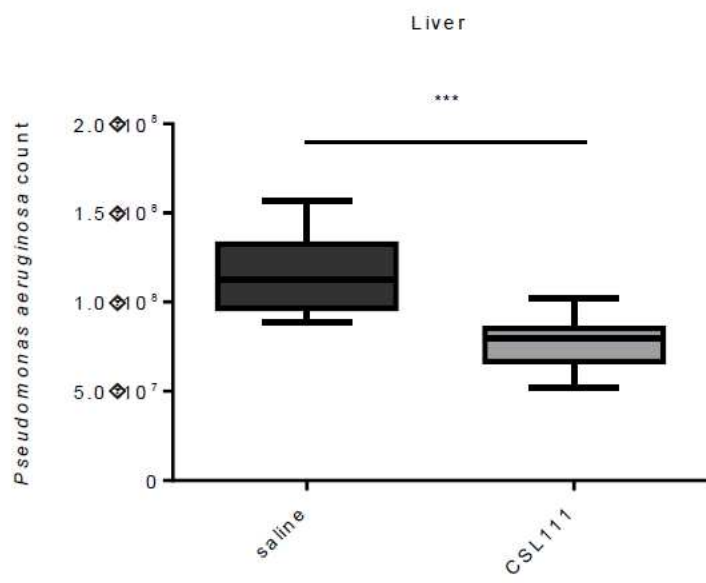


Figure 5

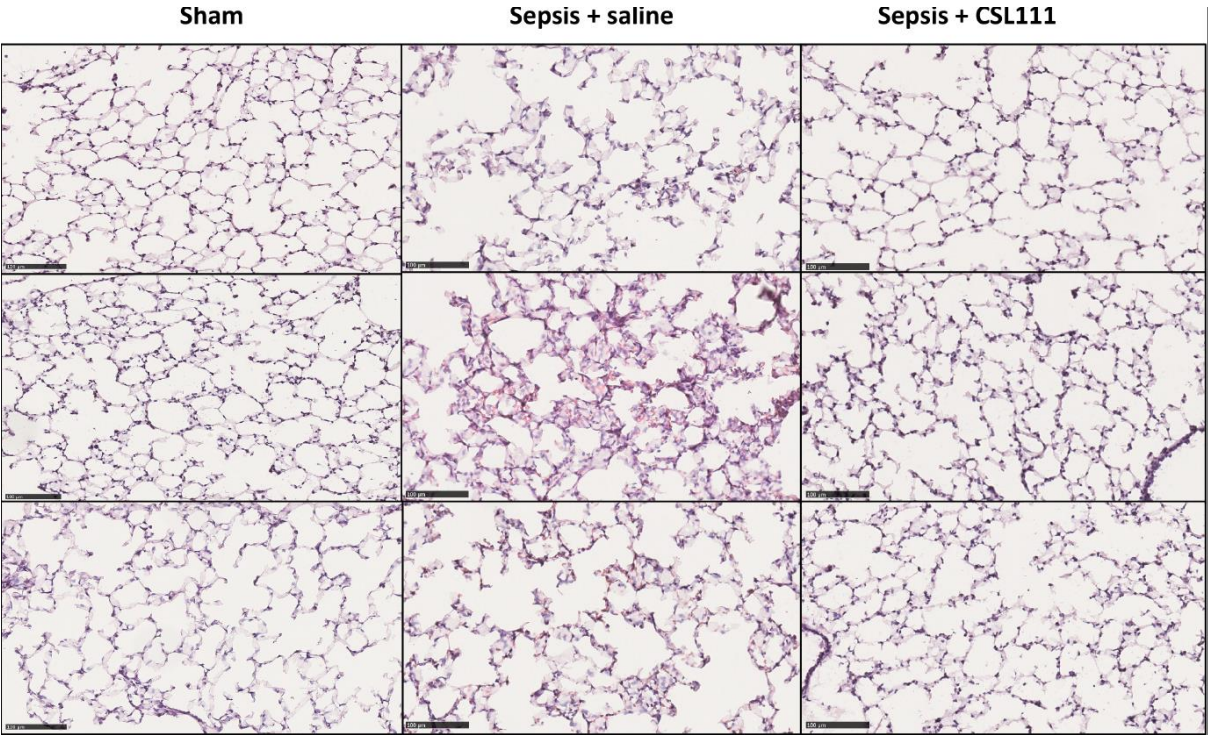
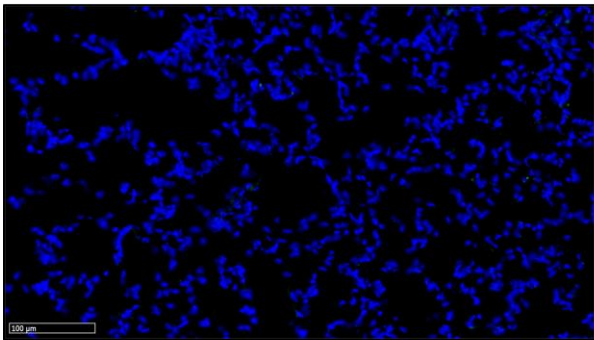
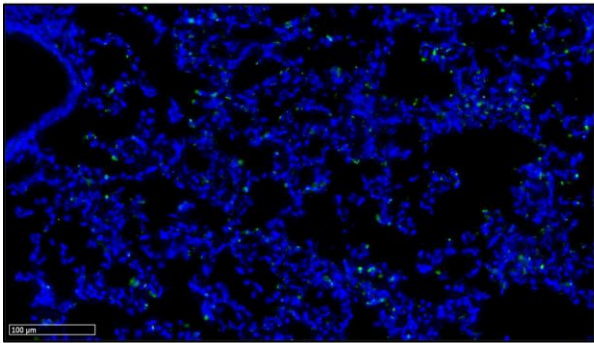
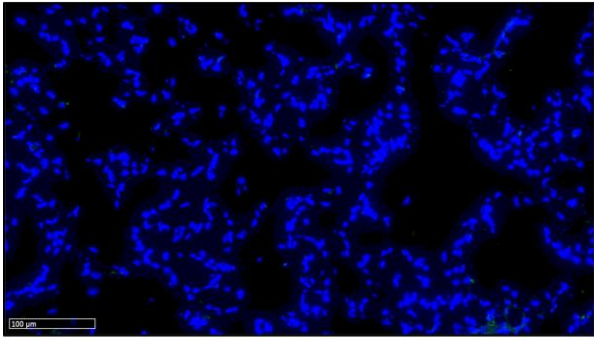
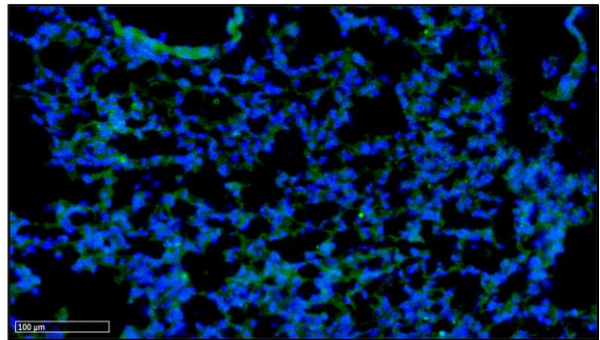
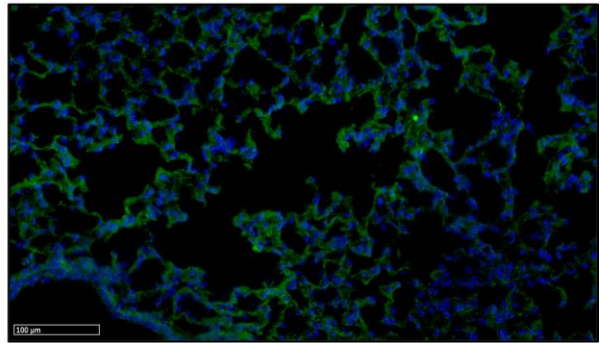
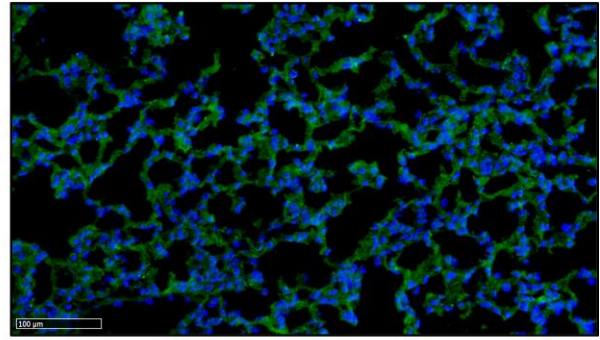


Figure 6

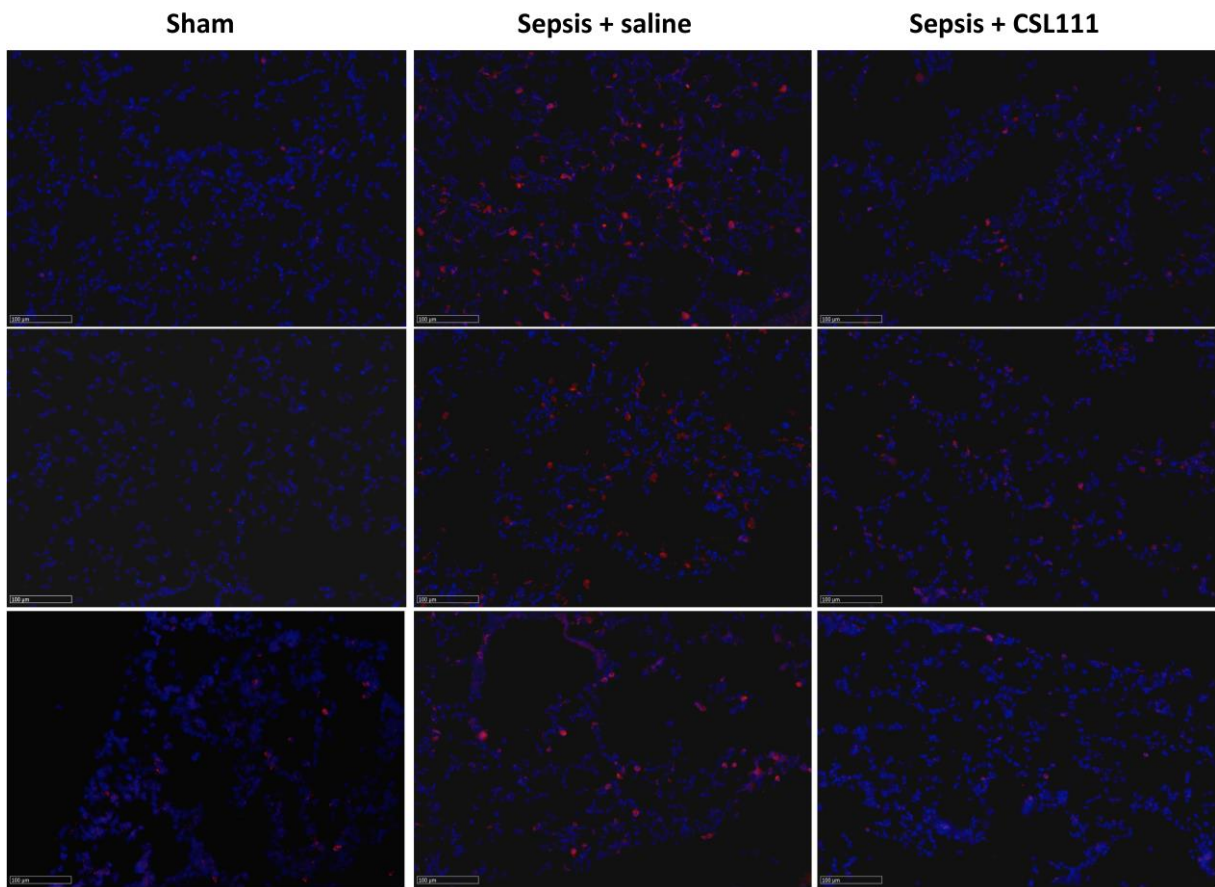
**Sepsis + saline**



**Sepsis + CSL111**



**Figure 7**



**Figure 8**

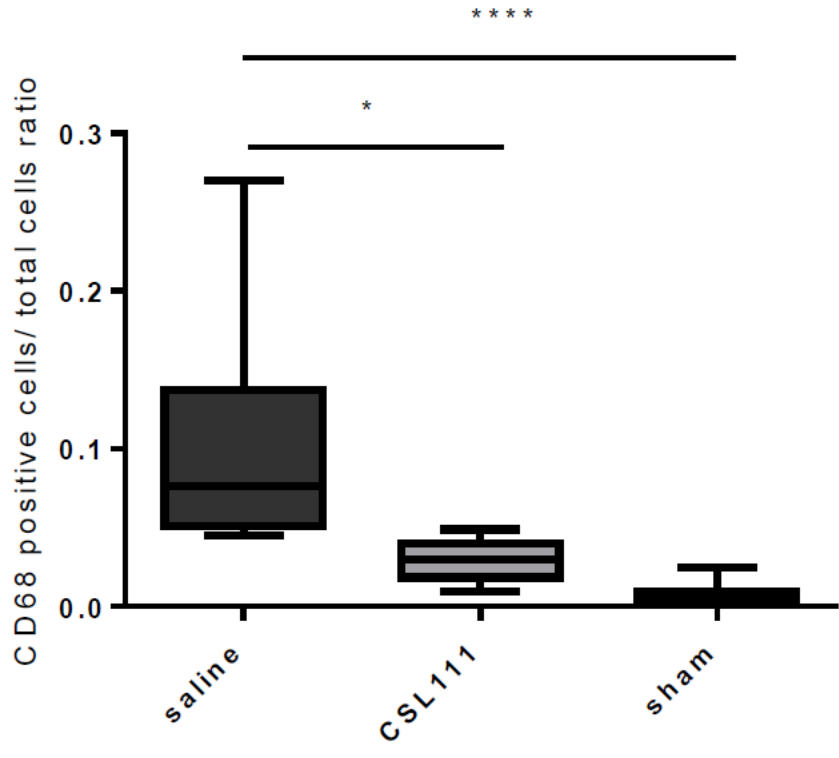


Figure 9



## Supplemental Digital Content

### **Caecal ligation and puncture (CLP)**

CLP was performed as previously described by Rittirsch et al (1). After mouse anesthesia, the abdomen was opened; then the caecum was exteriorized. A ligature was done on the proximal part of the caecum just after the ileocecal valve and then the caecum was perforated from side to side with a 21G needle to produce a severe CLP-induced sepsis. The caecum was gently squeezed to extrude a small amount of feces through the perforation holes. The caecum was then returned into the peritoneal cavity and the abdominal wall was closed with a suture. Just after surgery, saline (1.2 ml/100g body weight), and buprenorphine (5ng/100g body weight) were administered. Two hours after the CLP, each animal was blindly administered either CSL111 (40 mg apoA1/kg) or saline. The injection was done through the caudal vein and was repeated at 24h and 48h after the CLP. Sham-operated mice (n=16) underwent the same surgical procedure but the caecum was neither ligated nor perforated.

### **Intraperitoneal injection of bacteria (*IP model*)**

*This second model of sepsis induced a peritonitis characterized by a rapid intravascular transfer of bacteria (2). Escherichia coli IAI76 strain bacteria were IP-injected. To determine the optimal bacterial concentration, a correlation curve between optical density (OD) at 600 nm of the bacterial solution and the number of colony forming unit (CFU) developed on Luria-Bertani (LB) agar was performed. Bacteria were cultured in LB culture medium at 37°C for 20 hours. Bacteria were washed twice with saline by centrifugation (3000g for 15 minutes). Dilutions were then realized in order to seed culture media that were subsequently incubated at 37°C for 24 hours before CFU count. The concentration of bacteria was estimated by spectrophotometry (OD 600 nm).  $4 \cdot 10^7$  CFU/ml were injected into the intraperitoneal cavity in a volume of 400  $\mu$ L of saline. To choose this dose, a pilot experiment was*

performed with injection of different concentrations of bacteria, in order to reach a severe but not 100% lethal infection (70% of mortality). Briefly, after mouse anesthesia (n=10), different concentrations of *E. coli* were IP-injected (from  $10^7$  to  $10^8$  CFU/ml).  $4 \cdot 10^7$  CFU/ml concentration was chosen because the mortality rate at 36 hours was 80%. (figure S6). In conclusion, a concentration of  $4 \cdot 10^7$  CFU/ml of *Escherichia coli* IAI76 strain bacteria was injected into the intraperitoneal cavity in a volume of 400  $\mu$ L of saline.

After injection of bacteria, *each animal was blindly administered either CSL111 (40 mg/kg) or saline. Injections were done in retro-orbital vein. Sham-operated mice underwent an abdominal surgery without any bacterial injection.*

#### ***Pseudomonas aeruginosa pneumonia model (PA model)***

The bacterial strain ATCC 27853 was grown to mid-logarithmic phase in a Brain heart infusion (BHI) for 24 hours at 37 °C. Bacteria were then washed twice and diluted in a PBS solution to a final concentration of  $4 \times 10^8$  CFU/ml. Our protocol was approved by our local ethic committee (20938-2019031114427274). C57Bl/6 mice (8-10 weeks) were anaesthetized with 2% inhaled isoflurane and Buprenorphine (0.05mg/kg SC) and placed in supine position. The cervical region was sterilized and a 1 cm midline skin incision was made just cranial to the thoracic inlet. The trachea was visualized by blunt dissection and was then cannulated with a 22G intravenous catheter. 50 $\mu$ l of *Pseudomonas aeruginosa* solution or 50 $\mu$ l of saline were then instilled in the trachea through the catheter. Skin was sutured and animals were left for recovery in a warm cage. Analgesia and hydration were performed with buprenorphine and saline injection. Until anesthesia recovery, animals were maintained at 37° C in their cages and afterward were housed in a temperature- and light-controlled room with free access to water and food. Two hours after the PA model, each animal was administered either CSL111 (40 mg apoA1/kg) or saline. The injection was done through the caudal vein.

## **Plasma and histological analyses**

Twenty-four hours after surgical procedure, the animals were sacrificed.

*Collection of plasma and organ samples:* Four hours before the CLP, 300 $\mu$ L of blood were sampled on EDTA from the retro-orbital vein. The blood was centrifuged at 2000g at 20°C for 10 minutes, the plasma (supernatant) was centrifuged a second time (2000g, 20°C, 10 minutes) and stored at -80°C. Whole blood was also sampled for determining bacterial concentration.

In the 24-hour study, mice were exsanguinated by cardiac puncture after a thoracotomy (about 500  $\mu$ l of EDTA-blood was collected). The same procedure of centrifugation and storage as described above was performed. After ligation of the right lung, the left lung was inflated with optimal cutting temperature (OCT) solution at a pressure of 25cmH<sub>2</sub>O, placed in OCT solution before freezing in liquid nitrogen and subsequent sectioning at 6 $\mu$ m. The remaining part of the lung was divided in 2: One part was weighted and incubated with RPMI (without phenol red) for 24 hours at 37°C and then stored at -20°C. The other part was stored at -20°C in a Trizol solution for RNA extraction. For histological studies, liver, right lung, spleen and kidney samples were also stored at -20°C in OCT solution.

In the PA model, at 24 hours, mice were exsanguinated by cardiac puncture after a thoracotomy (about 500  $\mu$ l of EDTA-blood were collected). A bronchoalveolar lavage (BAL) was performed in the right lung. In brief, after ligation of the left lung, the trachea was cannulated with a 22G catheter. 1ml of precold sterile PBS was slowly injected into the lung and aspiration repeated three times. The lavage fluid was then collected and centrifuged at 1500g at 4°C for 10 minutes. The supernatant was collected and stored at -80°C. After ligation of the right lung, the left lung was inflated with OCT solution at a pressure of 25cmH<sub>2</sub>O, placed in OCT solution before freezing in liquid nitrogen and subsequent sectioning at 6 $\mu$ m. Liver was also stored at -20°C in OCT solution.

### *Plasma cell-free DNA (cf-DNA) measurement*

Circulating DNA may result from neutrophil overactivation (NETosis or production of extracellular traps) leading to the release of their genetic material, but also from the all potentially dying cells including endothelial cells (3).

The concentration of cf-DNA was determined in 10  $\mu$ L of plasma using the Quant-iT™ high-sensitivity DNA assay kit and a QubitH fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. After the production of a standard curve with thymus calf DNA, plasma samples (10  $\mu$ L) were disposed in a 96 well-plate, diluted with 90  $\mu$ L of Tris-EDTA and a fluorescent reagent (100  $\mu$ L) was added protected from the light. The fluorescence was then measured ( $\lambda$  excitation=485nm,  $\lambda$  emission= 535nm).

### *Cytokine and endothelial marker measurement*

Cytokine levels were measured using the Milliplex cytokine magnetic kit (Merck Millipore® France). The concentrations of pro-inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ), IL6, and TNF- $\alpha$  as well as anti-inflammatory cytokine IL-10 were determined in plasma obtained 4 hours before and 24 hours after the CLP, using a sequential ELISA method. Endothelial markers were measured by multiplexed ELISA using a cardiovascular panel (Merck Millipore® France). MMP-9, PAI-1, soluble E-selectin, soluble ICAM-1, soluble VCAM-1 were measured in plasma obtained 4 hours before and 24 hours after the CLP.

In the PA model, the concentration of IL6 cytokine was determined in the BAL fluid and in plasma using the same ELISA method.

### *RNA isolation and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*

Lung is a major organ that becomes dysfunctional in sepsis. We tested the hypothesis that CSL111 may limit or delay the mortality by controlling lung inflammation via inhibition of lung pro-inflammatory

molecule expression. Lung slice were homogenized in Trizol reagent and RNA was isolated using the Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). In total, 1µg of RNA was reverse transcribed and RT-QPCR using an Applied Biosystems 7700 PCR machine (Foster City, CA, USA) was performed. In all samples, the mRNA transcript levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and the adhesion molecules E-selectin and ICAM-1, VCAM-1 were determined.

#### *Histological analysis of the lung*

Lungs were perfused with OCT medium in situ and removed before snap freezing with liquid nitrogen. Ten-micron frozen sections were fixed with acetone for 10 minutes for immuno-histofluorescence and with 4% paraformaldehyde for hematoxylin/eosin staining. Anti-human apoA1 (#178422, 1.4 mg/mL) and anti-mouse CD68 (#HM1070 100 µg/mL) antibodies were applied for 1h30 after blocking non-specific sites with 10% bovine serum albumin in PBS for 30 minutes. Appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa 488 and Alexa 594 respectively were incubated for 1h30 at room temperature. Each step was separated by 3 washes with 0.05 % Triton X100-PBS. The sections were mounted in Dako fluorescence mounting medium before analysis with NanoZoomer S60 digital slide scanner (Hamamatsu).

An observer blinded to the experimental conditions performed histological analysis quantification. Positivity for CD68 and ApoA1 immunostaining and cells counting were determined by using ImageJ® software.

### *Bacteria count*

HDLs have been shown to bind LPS and to promote its clearance. We tested whether CSL111 may limit the effects of sepsis by reducing the concentration of circulating bacteria.

In the CLP model, serial dilutions of whole blood were performed in saline and 100 µL of these solutions were seeded in LB Agar culture medium. After a 24h incubation at 37°C, the CFU were counted in order to evaluate the bacterial concentration. The same protocol was carried out with tissue homogenates from liver, lung, spleen and kidney in order to determine the number of CFU.

In the PA model, a bacterial count was also performed (liver and lung). Tissues were homogenized using an Ultra-Turrax® device and then diluted in PBS 1X (1mg of tissue for 20 ml of PBS 1X). After centrifugation at 400g for 5' in order to discard tissue debris, the supernatant was diluted in brain heart infusion (BHI) broth (10µl of the solution + 90µl of BHI) before incubation at 37°C in a 96-well microplate. The plate was then incubated at 37°C. An automated spectrophotometer (Bioscreen C, ThermoLifeScience®) was used to monitor growth curves. Optical density (OD) was read at 600 nm at T0, T2, T4, and T16 hours.

1. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009;4(1):31–6.
2. O'Dwyer MJ, Starczewska MH, Schrenzel J, Zacharowski K, Ecker DJ, Sampath R, Brealey D, Singer M, Libert N, Wilks M, Vincent JL. The detection of microbial DNA but not cultured bacteria is associated with increased mortality in patients with suspected sepsis—a prospective multi-centre European observational study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Mar;23(3):208.e1-208.e6.
3. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Aug;5(8):577–82.

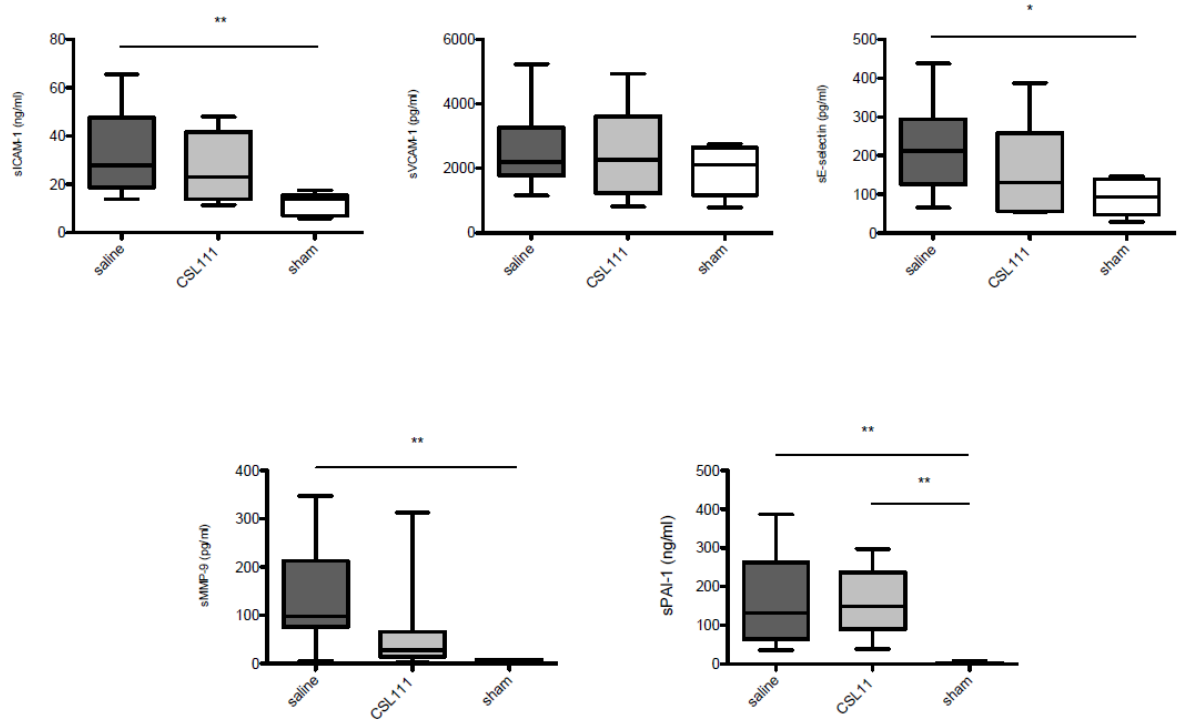


Figure S1

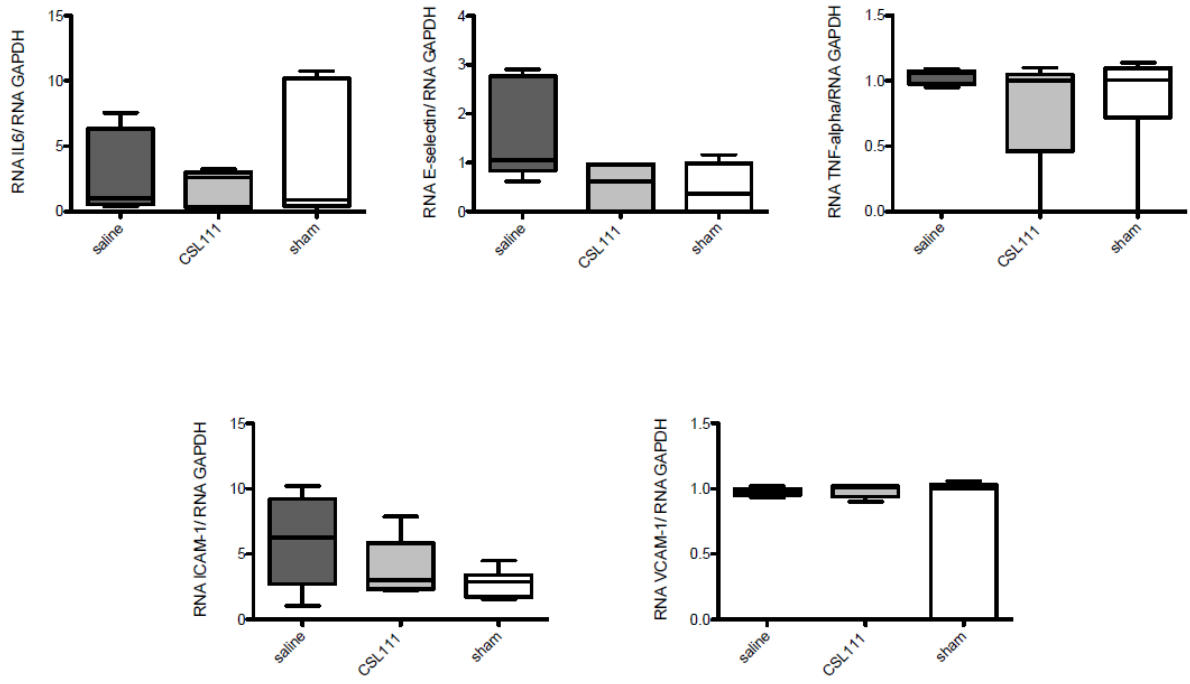


Figure S2



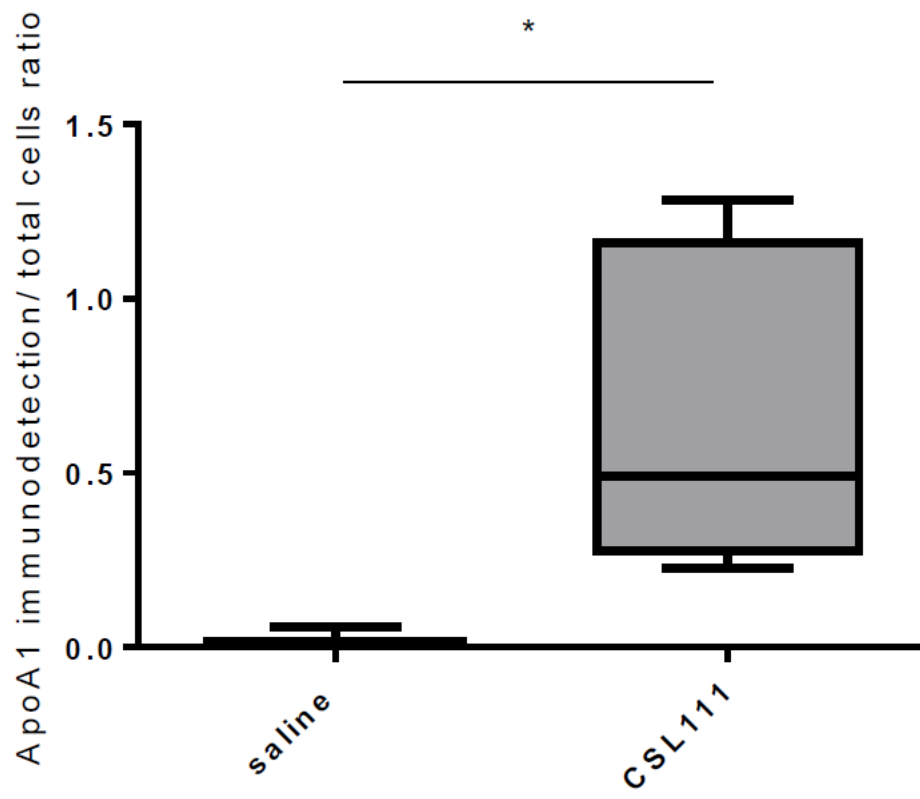


Figure S3

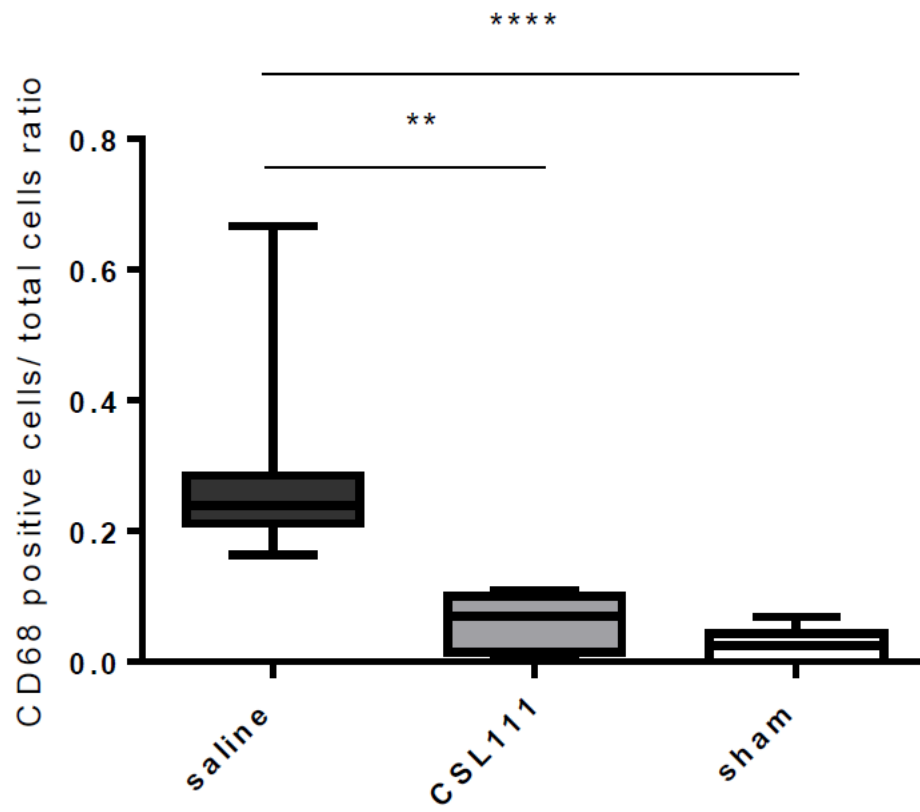


Figure S4

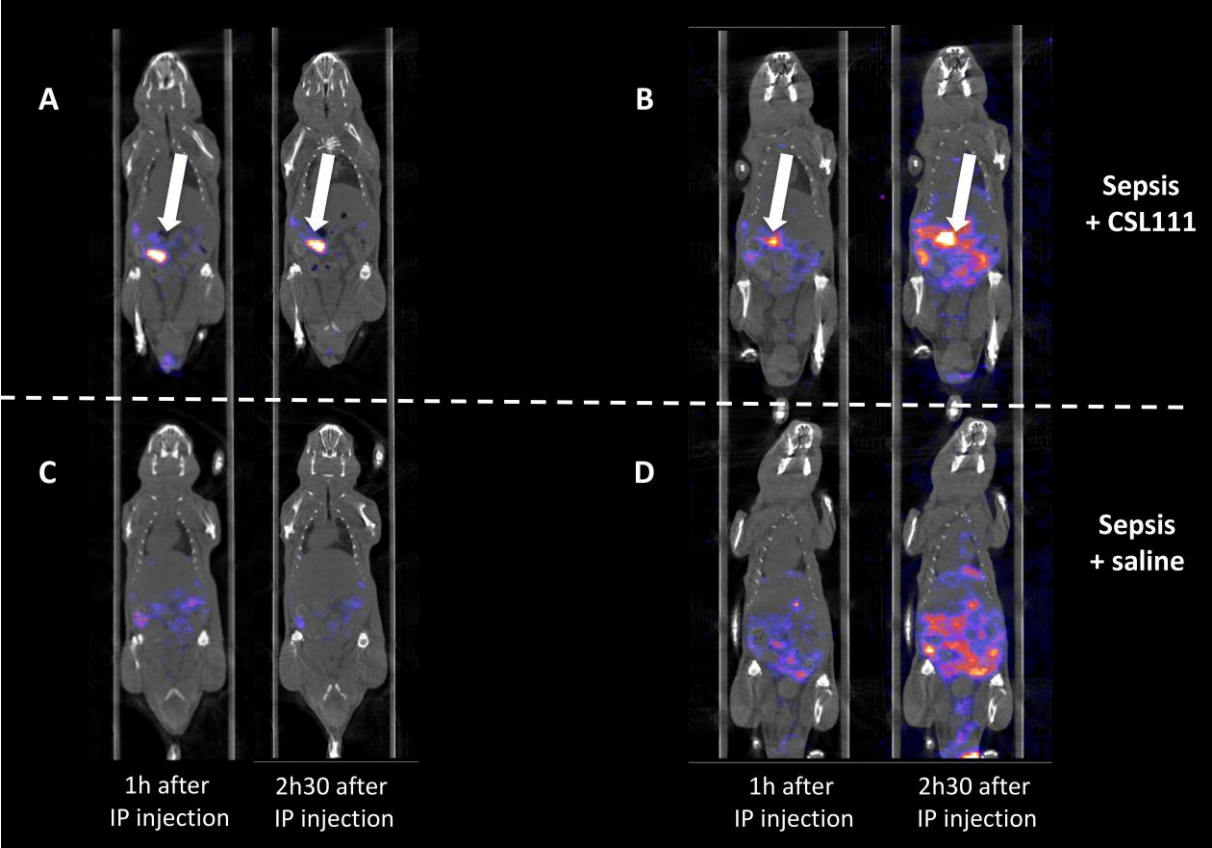


Figure S5

## **High-density Lipoproteins during sepsis: from bench to bedside**

Sébastien TANAKA<sup>1,2</sup>, David COURET<sup>1,3</sup>, Alexy TRAN-DINH<sup>2,4</sup>, Jacques DURANTEAU<sup>5,6</sup> Philippe MONTRAVERS<sup>2,7</sup>, Anna SCHWENDEMAN<sup>8</sup>, Olivier MEILHAC<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France.

<sup>2</sup> AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, CHU Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

<sup>3</sup> CHU de La Réunion, France.

<sup>4</sup> Inserm UMR1148, Laboratory for Vascular Translational Science Bichat Hospital, Paris France.

<sup>5</sup> AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Université Paris-Sud, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

<sup>6</sup> Laboratoire d'étude de la Microcirculation. « Bio-CANVAS: biomarkers in CardioNeuroVascular DISEASES » UMRS 942, Paris, France.

<sup>7</sup> Inserm UMR1152. Physiopathologie et Epidémiologie des Maladies Respiratoires. Paris, France.

<sup>8</sup> University of Michigan, USA.

## **Introduction**

Despite a better comprehension of this entity, sepsis remains a pathology with a high rate of morbi- and mortality worldwide (1,2). During the last decade, in spite of improvements in supportive therapy and care, the overall worldwide mortality did not decrease under 30% (3,4). Pathophysiological pathways involved in sepsis are complex, including pro- and anti-inflammatory signaling along with major non-immunological responses such as cardiovascular, neuronal, autonomic, hormonal and metabolic responses, as well as activation of coagulation (5). Recent definitions and consensus underline that sepsis is clearly defined as a life-threatening organ dysfunction caused by deregulated host response to infection (2). The failure of therapies using specific anti-inflammatory treatments may be due to the complexity of sepsis signaling, modulation and pattern, and finally to the poor understanding of the pathophysiology.

High-density lipoproteins (HDLs) represent a family of particles characterized by their ability to transport cholesterol from peripheral tissues back to the liver that confers to them an anti-atherogenic role and globally a cardiovascular protective effect (6,7). Many experimental studies emphasize on other pleiotropic properties of HDLs, including anti-inflammatory, anti-apoptotic or antioxidant functions (8). Furthermore, HDLs have the property to bind and neutralize lipopolysaccharide (LPS) (9), that could be particularly relevant in septic conditions. Other studies have also demonstrated that infusion of reconstituted HDL (rHDL) or HDL mimetic particles decreased morbi- and mortality in animal models of sepsis (10–12).

Because of their pleiotropic protective effects, HDLs may represent a potential future therapeutic target to be explored in human sepsis. The objectives of this present review are to describe HDL properties that can play a role in sepsis and to summarize clinical and experimental studies involving HDL during sepsis.

## **HDL structure and diversity**

Lipoproteins are macromolecular particles composed by proteins including apolipoproteins associated with a phospholipid layer containing a lipid core consisting in free cholesterol, cholesterol esters and triglycerides (13). They are classified according to their density, which is proportional to their protein content: chylomicrons, very low-density lipoproteins (VLDLs), intermediate density lipoproteins (IDLs), low-density lipoproteins (LDLs) and high-density lipoprotein (HDLs), being the particles with the highest protein content.

Specifically, HDLs are defined by a density ranging from 1.063 to 1.21 (14,15). To characterize this lipoprotein population, different techniques are used and underline the heterogeneity of HDL subclasses. Ultracentrifugation allows isolation of HDL fractions into HDL2a, HDL2b and HDL3 (16), whereas electrophoresis on gradient gels separates HDL particles by size (HDL2a, HDL2b, HDL3a, HDL3b, HDL3c) (17). Two-dimensional gel electrophoresis has been used to separate HDL populations according both to their charge and size into small pre- $\beta$  and large  $\alpha$  1- $\alpha$  4 HDL particles (18). Rosenson *et al.* also described a new classification according to the size determined by nuclear magnetic resonance (19). Finally, HDL particles may be classified according to their major lipoprotein contents (20,21).

As compared to other lipoproteins, HDLs are also characterized by their abundant protein content and protein diversity (22,23). Although HDLs are mainly composed by apo A-I, recent proteomic analyses emphasized on the numerous proteins that are transported by HDLs, including enzymes, acute phase response proteins, complement system proteins and proteinase inhibitors (24,25). Lipid composition and their ability to transport nucleic acids of eukaryotic or non-eukaryotic origin may also account for the diversity of HDL particles (26).

## **HDL metabolism, catabolism and main function: reverse transport of cholesterol (Figure 1)**

HDL metabolism is complex and influenced by numerous actors (receptors, proteins involved in lipid transfer, transporters and enzymes). One major function of HDL metabolism is the reverse cholesterol transport (RCT) permitting the efflux of cholesterol from peripheral cells back to the liver. RCT is the best described and investigated function of HDL suggested to the base of their atherosclerotic protective effect (6,7,27,28).

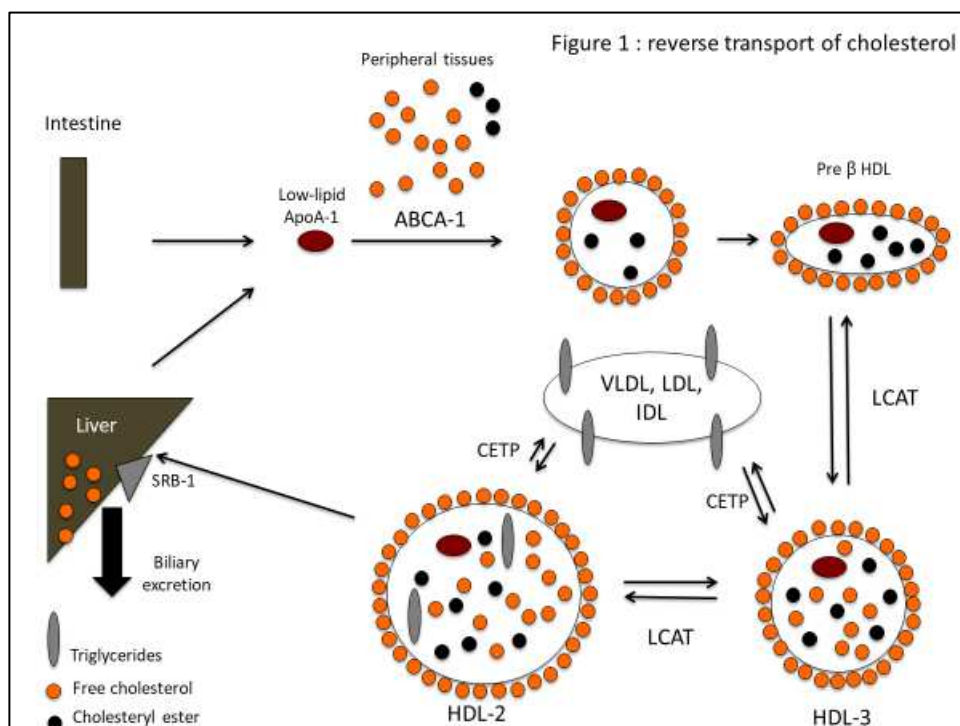
The first step of the biosynthesis of HDL particles is the release of lipid-free or lipid-poor apolipoprotein A-1 by the liver and intestine. Lipid-poor apoA-1 will then acquire phospholipids and free cholesterol via their interaction with ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), which is a membrane transporter protein mainly expressed by macrophages and hepatocytes, but also in the brain and other tissues (29). With the acquisition of these lipids, HDL particles become discoidal, forming disk-shaped pre- $\beta$  HDLs (30,31). Then, lecithin-cholesterol acyl-transferase (LCAT), which is activated by apoA-1 will esterify free cholesterol. Cholesterol esterification leads to a structural modification of HDL particles, which become smaller, dense and spherical (HDL<sub>3</sub>) (32,33). HDL<sub>3</sub> particles continue to accept free cholesterol and apolipoproteins forming bigger and lipid-rich particles named HDL<sub>2</sub>. HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> have the possibility to exchange esterified-cholesterol against triglycerides (TG) from others lipoproteins (VLDL, IDL, LDL). TG molecule is bigger than esterified-cholesterol, which participates in increasing the size of HDL particles. This important remodeling system is performed by cholesteryl ester transfer protein (CETP) (34).

Endothelial and hepatic lipases (EL and HL) promote hydrolysis of residual triglycerides and some phospholipids of HDL leading to the conversion of HDL<sub>2</sub> to HDL<sub>3</sub> and pre $\beta$  -HDL that accelerates the metabolism of HDLs (35). The phospholipid transfer protein (PLTP) is able to transfer the phospholipids from VLDL and IDL to HDL particles

during lipolysis that produces HDL<sub>2</sub> and can also convert HDL<sub>3</sub> particles to HDL<sub>2</sub> and pre $\beta$ -HDL (36).

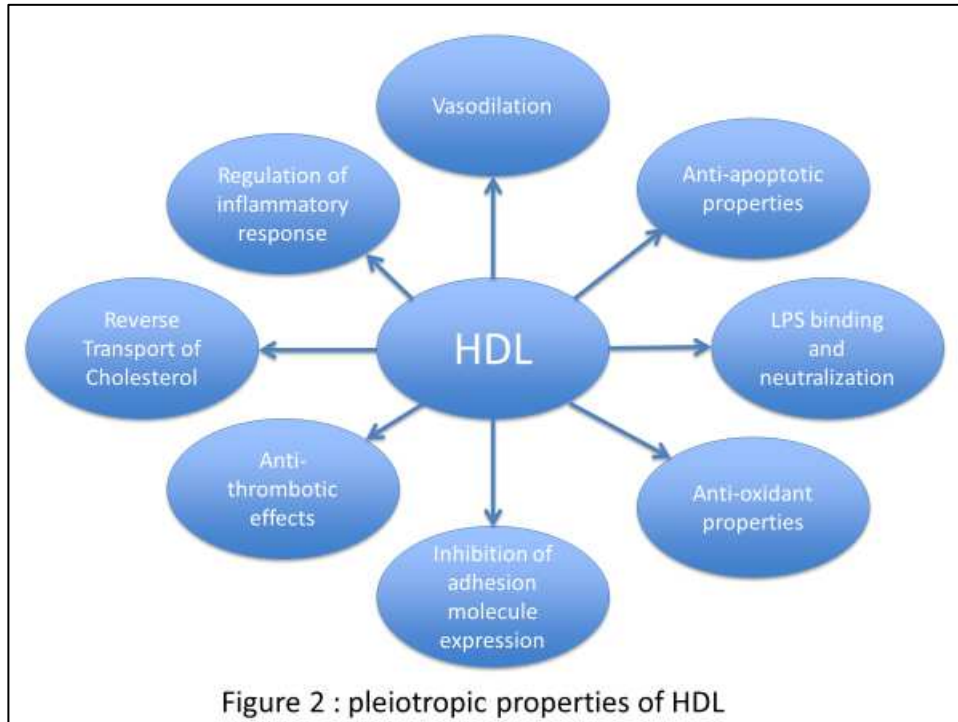
HDL<sub>2</sub> is then removed from the circulation by the liver via the scavenger receptor class B type I (SRB1), leading to the degradation of the lipids by hepatocytes and their excretion into the bile. This interaction with SRB1 releases lipid-poor Apo A-1, which initiates a new cycle of RCT (37).

Liver and kidney are the main organs in charge of HDL catabolism: lipid-poor Apo A-1 are taken up by specific kidney receptors (cubilin and megalin) permitting their degradation (38). In the liver, different receptors participate in the endocytosis of HDL particles. One of them is the  $\beta$ -chain of ATP synthase which, by interacting with HDLs, leads to the production of ADP and the activation of the P2Y<sub>13</sub> receptor that triggers HDL endocytosis (39). CD36 receptor induces the direct endocytosis of HDL particles and a selective absorption of esterified cholesterol present in HDL particles (40).





## Pleiotropic effects of HDL (Figure 2)



### 1. Lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) binding and neutralization properties of HDL (figure 3)

LPS is the major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria (41). In noncapsulated strains, LPS is exposed on the cell surface. Three structural components are described; a hydrophilic core polysaccharide chain, a hydrophilic oligosaccharide side chain specific to the bacterial serotype made of O-antigen repeat units and a hydrophobic lipid section lipid A.

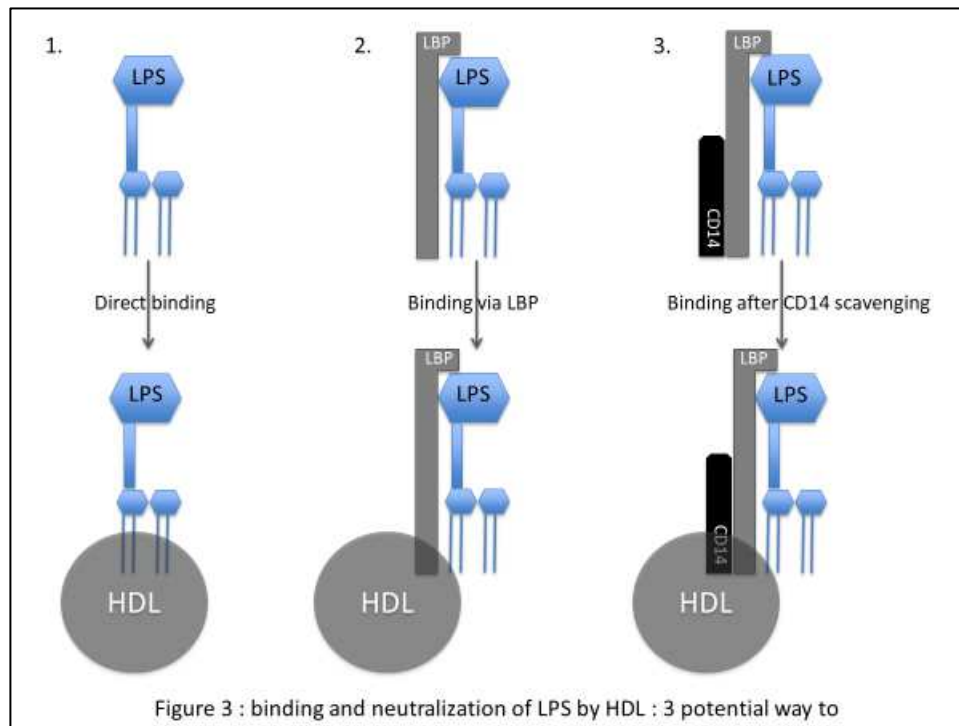
Numerous studies have demonstrated that all lipoproteins (chylomicrons, VLDL, LDL and HDL) are capable to bind Gram-negative LPS (42–46). However, it is clearly established that LPS preferentially binds HDL particles relative to other lipoproteins (45,47–49). Levels *et al.* have incubated different labeled LPS chemotypes with delipidated or normal plasma and

determined LPS fluorescence profiles by high-performance gel permeation chromatography (44). These authors demonstrated that LPS binding of to lipoproteins is highly specific and that HDLs have the highest binding capacity for LPS as compared to that of other lipoproteins (50,51). Furthermore, Levine *et al.* have shown that transgenic mice expressing human Apo A-1 displayed lower cytokine levels after LPS injection compared to control mice (52). This interaction is facilitated by the action of specific lipid transfer proteins such as CETP, PLTP and LPS binding protein (LBP) (53,54). These specific proteins permit the transfer of LPS to lipoproteins. For example, as described by Vesey *et al.*, mainly LBP but also PLTP can extract LPS from bacterial membranes and transfer it to HDL particles in human serum (55). In a murine model of sepsis, Lamping *et al.* have demonstrated that intra-peritoneal injection of recombinant LBP limited LPS-induced cytokine release and mortality (56).

However, the mechanisms underlying the association between LPS and HDLs remain unclear (57): LPS lipid A diglucosamine-phosphate region seems to be the key part of LPS molecules allowing the interaction between LPS and HDL particles (58). To characterize this interaction, X-ray diffraction measurements were performed using a synchrotron double-focusing monochromator-mirror camera. In brief, in the absence of HDLs, the molecular shape of lipid A was conical and was converted into a cylinder in the presence of HDLs. This structural modification could better expose the epitopes of the endotoxins for subsequent interactions with molecules such as LBP or CD14. In fact, HDL particles are probably not sufficient to neutralize the biologic activity of LPS (9). Theoretically, LBP is required to form a complex between LPS and CD14 able to bind HDL particles, permitting its neutralization.

Gram-positive do not have LPS, but LTA, an amphiphilic molecule formed by an hydrophilic polyphosphate polymer linked to a neutral glycolipid which is a major immunostimulatory component for these bacteria (59,60). LTA is a potent endotoxin capable of inducing hemodynamic, hematological, and metabolic changes in the same magnitude to those induced

by LPS (61). The association of LTA with lipoproteins shows a striking similarity with that of LPS. HDL seems to have the highest affinity for LTA (62). Grunfeld *et al.* have demonstrated that HDL can inhibit macrophage activation by LTA (63).



## 2. Inhibition of adhesion molecule expression

During sepsis and inflammatory states, the adhesion of leukocytes to endothelium is a key step allowing their migration within the tissues (5,64–66). Cockerill *et al.* have shown that physiological concentrations of human isolated HDLs inhibited *in vitro* the expression of leukocyte adhesion molecule expression (V-CAM-1, ICAM-1, E-selectin) on endothelial cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) or interleukin-1 (67). Reconstituted HDLs also inhibited the TNF- $\alpha$ -induced expression of V-CAM-1. The same authors have confirmed this action *in vivo* in a porcine model of inflammation (68). In this study using a model of cutaneous inflammation in healthy large white pigs receiving either reconstituted HDLs nor PBS, the level of vascular endothelial cell E-selectin in IL-1  $\alpha$  induced skin lesion was

measured by the uptake of a radiolabeled anti-E-selectin antibody. In this *in vivo* study, reconstituted HDL infusion significantly inhibited IL-1  $\alpha$  -induced E-selectin expression. Another study emphasized the fact that rHDLs attenuated adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxin shock whereas pretreatment of LPS-injected rats with rHDL limited the expression of P-selectin and ICAM-1 caused by endotoxin in kidney (69). Another possible mechanism of HDL protective effects is the modulation of transcription factors, which may decrease adhesion molecule expression via the inhibition of nuclear factor NF- $\kappa$ B activity (70).

### 3. Regulation of inflammatory response in macrophages

HDLs may also be a key modulator of inflammatory response in macrophages (71–73). One important finding is that HDLs stimulate the transcriptional regulator ATF3, which down-regulates inflammatory pathways that may in turn decrease the inflammatory response in case of sepsis (73). Moreover, *Zhu et al.* have shown in murine macrophages that human serum amyloid A (SAA) dramatically upregulates, the expression and secretion of a group of phospholipases (sPLA2-IIIE and sPLA2-V), which are late pro-inflammatory mediators family (74). In this *in vitro* study using purified HDL, HDL dose-dependently attenuated SAA-induced secretion of both sPLA2-IIIE and sPLA2-V. HDLs were also able to attenuate SAA-induced secretion of TLR4-dependent cytokines and chemokines (IL-6, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and RANTES).

### 4. Microvascular vasodilation and endothelium repair

HDLs have the property to stimulate the endothelial NO synthase (eNOS), which is involved in inhibiting the adhesion of monocytes to the endothelium and promotes microvascular vasodilation (75). This up-regulation of eNOS expression is dependent on SR-B1 receptor.

Specific sub-classes of HDL particles bind with different affinity to SR-B1. For example, lipid-poor and lipid-free apoA-1 have a lower affinity for this receptor, leading a reduced vasodilation property (76). HDL particles can also stimulate the production of prostacyclin, which is a powerful vasodilator. Kontush *et al.* have shown that HDL<sub>3</sub> sub-fraction had a better capacity to improve NO production than HDL<sub>2</sub> because of its enrichment of sphingosine-1-phosphate (S1P), which stimulates the production of prostacyclin (77). Moreover, HDL binding to SR-BI sequentially activates Src family kinases, PI3K, Akt and MAPK. These events lead to increase Rac activity, lamellipodia formation, and ultimately to enhance endothelial cell migration, which improves endothelial repair and monolayer integrity. A recent work in mice also indicates that HDLs activate the recruitment of endothelial progenitor cells into the intimal layer after endothelial injury (78).

#### 5. Antithrombotic effects

HDLs stimulate the endothelial production of NO and prostacyclin which are inhibitors of platelet activation. Furthermore, HDLs prevent platelet hyper-reactivity by limiting intraplatelet cholesterol overload and the interaction of apoA-1 on platelet ABCA1 and SRB1 receptors (79). This leads to the inhibition of the pro-coagulation cascade and subsequent clot formation (80). HDLs may also prevent of the endothelial thrombotic activation, by promoting prostacyclin and Cox2 production and by reducing the expression of tissue factor and of adhesion molecules (81,82).

#### 6. Antioxidant properties

Paraoxonase (PON1) is an HDL-associated esterase, protecting lipoproteins against oxidation (83–87). PON1 is able to hydrolyze lipid peroxides and especially oxidized cholesteryl esters and phospholipids (83,88). Moreover, PON1 also hydrolyzes phosphatidylcholines into

lysophosphatidylcholines, which improve the bactericidal activity of neutrophils potentially resulting in a protective effect in experimental sepsis (89). Shih *et al.* have demonstrated that PON1-deficient mice are susceptible to oxidative stress and that HDLs isolated from these mice were unable to prevent LDL oxidation (90). The authors performed a co-culture of human aortic endothelial cells and smooth muscle cells pretreated with HDLs isolated from wild-type or PON1-knockout mice. HDLs isolated from PON1<sup>+/+</sup> mice were able to inhibit lipid hydroperoxide (LOOH) accumulation in human LDLs and greatly reduced the amount and chemotactic activity of MCP-1. HDLs from PON1<sup>-/-</sup> mice were dysfunctional in these aspects (90). The global antioxidant effect of HDLs is evaluated via their capacity to inhibit LDL oxidation. This property consists in the transfer of oxidized lipids from oxidized LDL (oxLDL) (hydroperoxides and lysophosphatidylcholine) to HDL particles and by the inactivation of oxidized lipids (91). Lastly, HDLs are able to limit oxidation by decreasing ROS production via the inactivation of neutrophil NADPH oxidase (92). Oxidation is an important phenomenon observed in sepsis (93) and reduced HDL antioxidant function may participate in sepsis progression/severity.

#### 7. Anti-apoptotic properties

HDLs exert a protective effect on endothelial cell apoptosis by interfering with both receptor-mediated death signaling and mitochondrial apoptotic pathways. Suc *et al.* have demonstrated that HDLs have the capacity to inhibit apoptosis of endothelial cells induced by oxLDL (94). The same results were found after stimulation by TNF- $\alpha$  (95). In oxLDL-induced apoptosis, HDLs were shown to interact with endoplasmic reticulum (96). In this study, Muller *et al.* have shown that pretreatment of HMEC-1 cells with HDLs, followed by co-incubation with oxLDLs significantly reduced the time-dependent phosphorylation of IRE1 $\alpha$  and eIF2 $\alpha$ , two major endoplasmic reticulum stress sensors. They also reported that

HDLs prevented the activation of the pro-apoptotic mediators JNK and CHOP. De Souza *et al.* have shown that small, dense lipid-poor HDL<sub>3</sub> can protect endothelial cells from primary apoptosis and intracellular ROS generation induced by mildly oxLDL (97). As underlined by Nofer *et al.*, Akt signaling, a major anti-apoptotic pathway, is stimulated by HDLs in a model of endothelial cell apoptosis (HUVECs) (98). In this study, HDLs were also capable of inhibiting caspase-3 and -9 activation. Taken together these anti-apoptotic effects and more globally endothelium protective effects of HDLs may limit the progression and the severity of sepsis, in which endothelium aggression play a pivotal role.

### **Lipoprotein changes during human sepsis**

In critically ill patients and especially in septic patients, a reduction in lipid and lipoprotein levels is well documented (99,100). Clinical observations have shown that circulating levels of HDLs decrease during the acute phase of inflammatory state and especially during a sepsis (101–108). Van leeuwen *et al.* have demonstrated, that lipoprotein levels rapidly drop up to 50% of initial concentrations in patients with severe sepsis and that this rapid reduction was particularly marked in LDL and HDL cholesterol levels (101). Tanaka *et al.* have compared HDL profiles between septic and trauma patients (106). Although inflammation is exacerbated in these two entities, HDL-C levels were lower in septic patients, whereas their concentration was not altered in case of trauma.

During sepsis, several hypotheses may provide explanation for this dramatic reduction, including an acute over-consumption of HDL particles, a decrease in liver HDL synthesis, especially in case of hepatic failure and/or an increased clearance following an up-regulation of SRB1 (109). In the context of sepsis characterized by a severe inflammation-induced

capillary-leakage, HDL particles may easily be redistributed from the intravascular to the extravascular compartment (100,101).

The majority of these observational studies emphasized the negative correlation between HDL concentration and mortality (102–105). A low HDL concentration at day 1 was significantly associated with an increased mortality and adverse clinical outcomes with a cut-off ranging from 20 to 25 mg/dL (104,108). In a prospective study including 151 consecutive septic patients, a low apoA-1 concentration was independently related to 30-day mortality (102). Interestingly, a recent study has shown that variations in genes involved in HDL metabolism could contribute to changes in HDL-C levels but also to clinical outcomes following a sepsis (110). These authors have identified a rare missense variant in CETP (rs1800777-A) that was associated with significant reductions in HDL-C levels during sepsis. In this study, carriers of the A allele had an increased mortality, more organ failure and greater need for organ support compared to non-carriers.

However, other studies failed to find any link between HDL levels and mortality. Tanaka *et al.*, did not find any correlation between mortality and HDL concentration but a poor outcome defined as death or SOFA score >6 at day 3 was associated with lower HDL levels in a population of 50 septic patients (106). Van leeuwen *et al.* did not find any correlation between lipoprotein concentrations in survivors and non-survivors (101). In a pediatric population of severe meningococcal sepsis, total cholesterol levels at admission were statistically associated with a higher mortality but not HDL levels (111). Whereas triglycerides were associated with mortality in septic patients, no correlation was found with other lipoproteins and especially with HDL concentration (107).

HDL levels were also associated with morbidity in several studies (107,112,113): Tsai *et al.* have shown that in a cohort of cirrhotic patients with severe sepsis, low HDL concentration was associated with higher mortality and with a higher number of organ system failure such



as hemodynamic or renal function (112). In a two-year follow-up of patients with septic shock, low HDL levels were associated with increased risk of sepsis-associated acute kidney injury (AKI) and a decreased of estimated glomerular filtration rate (eGFR) (113).

Moreover, because sepsis still remains an important cause of mortality and morbidity, early biomarkers could be useful to establish a diagnosis of sepsis and also to indicate its severity. To date, there is no biomarker that fulfills these objectives in terms of sensibility and specificity (114). In this context, some authors have suggested that HDL levels could represent an early marker of sepsis severity. Chien *et al.* underlined the power of HDL and Apo A-1 levels at day 1 to predict the overall 30-day mortality rate (104). The areas under the receiver operator characteristic (ROC) curve for HDLs and Apo A-1 were 0.84 (95% CI [0.72-0.96]) and 0.87 (95% CI [0.77-0.98]) respectively. At ICU admission, according to Barlage *et al.* study (102), low HDL-C (AUC of the ROC 0.6,  $p=0.049$ ) and low apoA-1 (AUC of the ROC 0.604,  $p=0.041$ ) levels were predictive of sepsis-related mortality. To predict 90-day mortality, Tsai *et al.* reported a sensibility, specificity, positive and negative predictive values respectively at 0.794, 0.758, 0.871, 0.641 (112). The cut-off discriminating HDL level was 16.5 mg/dL. In a cohort of 200 patients enrolled at the emergency department with clinically suspected sepsis, comparing to different variables such as white blood cell count, lactate or platelets, HDL concentration was the best predictor of both development of multiorgan dysfunction syndrome and 28-day mortality (AUC of the ROC respectively 0.749 and 0.818) (105).

## **HDL function in inflammatory state**

Acute inflammation alters both lipoprotein composition and metabolism resulting in reduced anti-inflammatory properties, in particular for HDL particles (115–118). Numerous remodeling in HDL composition are currently described during these inflammatory states, such as apoA-1 dissociation from the particles, reduction of esterified cholesterol and decrease in HDL-associated enzymes (LCAT, CETP, or PON1 for example) (101,119). It is well established that the presence of blood endotoxins modulates HDL particle composition. For example, during infection and inflammation, SAA displaces apoA-1 within HDL particles, thus becoming the predominant apolipoprotein of septic HDLs. This increase is totally excessive relative to the drastic loss of apoA-1 (118,120). This observation was also described in inflammatory states following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (121).

HDL-associated PON-1 is also altered in septic condition. Novak *et al.* have described a dramatic decrease in PON-1 activity in septic patients versus controls (122). The oxidative environment induced by sepsis could result in an increased binding of free radicals to PON-1, leading to an overall decreased plasma activity of this enzyme. Platelet-activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH) activity, which is able to inhibit the formation of non-esterified fatty acid hydroperoxides from oxLDL was also reported to be altered in septic condition (123). With the reduction in plasma PAF-AH and PON1 activities during sepsis, HDLs display blunted protective effects against LDL oxidation (124).

Recent proteomic studies underlined the diversity of HDL-associated proteins in normal conditions (24,25). HDL proteome is clearly modified during inflammatory conditions (125). To our knowledge, only two studies have evaluated lipids proteomic composition in sepsis state. Sharma *et al.* evaluated the host proteome response in septic patients secondary to community-acquired pneumonia (126). This analyze have shown alteration in the

cytoskeleton, cellular assembly, movement, lipid metabolism and immune response in septic patients. Focusing on lipids, the authors demonstrated a decrease of some apolipoproteins (ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III et ApoE). In patients with nosocomial pneumonia, the same team has also shown a decrease of ApoA-I, ApoA-IV, ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE levels (127).

Lastly, reverse cholesterol transport is also impaired in inflammatory conditions (128–130). Specifically, De la Llera *et al.* have shown that in twenty healthy adults, an endotoxemia induced by LPS (3ng/kg) administrated as an intravenous bolus infusion led to a reduced capacity of HDLs to efflux cholesterol *in vitro* involving SRB1 and ABCA1 transporters but not ABCG1 (118). Interestingly, when comparing the 10 oldest septic patients to the ten oldest healthy subjects, the cholesterol efflux was significantly reduced in septic patients ( $24\pm 1.2\%$ ) compared to control subjects ( $31.5\pm 1.0\%$ ) (131).

In this context, dysfunctional HDLs has emerged as a new concept in sepsis as it was well documented in other diseases such as atherosclerosis, stroke or auto-immune pathology (29,121–125,128–132). It is now clearly established that HDLs become dysfunctional during sepsis, thus increasing inflammation and oxidative stress, and that these dysfunctional HDLs are markedly associated with a poor outcome during sepsis (133).

HDL size is also affected during inflammation and infection (118,134). De la Llera *et al.* have shown that LPS infusion in healthy volunteers led to a decrease of small and medium size particles without any change in the total number of HDL particles (118). These authors reported that LPS-induced endotoxemia in humans gave rise to a depletion of pre- $\beta$ 1a and small/medium-size HDL particles, determined by 2D-electrophoresis and nuclear magnetic resonance (NMR). Tanaka *et al.* have shown that HDL levels are dramatically decreased in

the acute phase of septic shock and that there is a shift toward large HDL particles (135). Another study underlined that both HDL size and HDL-C concentration were independently associated with coronary artery disease risk (136). In a recent study involving 402 patients who underwent carotid MRI assessment for lipid-rich necrotic core plaques, HDL particle size was significantly associated with HDL efflux capacity suggesting that differences in HDL efflux capacity may be due to structural differences in HDL particles (137). Small and medium-sized HDL particles measured by NMR spectroscopy were also protectively associated with coronary calcification in a cohort of 504 patients (138). However, because different techniques are used to assess HDL size, correlation of size with function should be exploited with caution.

In the light of these observations, HDL-C concentration is probably not sufficient to characterize HDL function. Size modification, HDL remodeling leading to changes in composition (proteome and lipidome) appear to be more relevant to make HDL dysfunction more helpful in clinical practice. In this context, since both quantitative and qualitative modifications of HDL particles are observed in septic conditions, supplementation with functional HDL in experimental pre-clinical models should be tested.

### **HDL-based therapies in experimental sepsis studies (Table 1)**

Because of HDL pleiotropic properties, the drastic reduction of HDL concentration and the dysfunction observed during inflammatory states, reconstituted HDLs or apoA-1 mimetic peptide infusion may represent a potential therapy in sepsis (12,52,69,109,139–151).

Several HDL mimetic peptides have been synthesized and are able to bind phospholipids and associate with native HDL particle (141,152). For example, apoA-1 mimetic peptide 4F (Ac-DWFKAFYDKVAEKFKAEAF-NH<sub>2</sub>) was synthesized using a solid

phase peptide synthesis method (142). Zhang *et al.* have shown in a rat model of sepsis that infusion of apoA-1 decreased plasma IL-6 concentration, improved the cardiac function, and reduced the mortality (143). Other studies have demonstrated that this peptide attenuated kidney, heart, vascular and lung injury and improved survival in experimental models of sepsis (11,144,145,153).

Reconstituted HDLs (rHDLs) were also tested in septic models (69,146,154). Different types of rHDLs have been experimented but rHDLs are usually prepared with a molar ratio of apoA-1 to soybean phosphatidylcholine (PC) (147). For example, McDonald *et al.* have shown that rHDL infusion limited the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule -4 in the renal glomerulus, attenuated renal injury and dysfunction and reduced the degree of histological tissue injury in the lung, liver and intestine (69).

### **rHDLs or mimetic peptide infusion in human sepsis?**

In the cardiovascular field, rHDLs have been tested in atherosclerotic and diabetic patients. Thirteen patients with type 2 diabetes mellitus received rHDLs and saline in a randomized crossover design study (155). Four and 72h after rHDL infusion, the anti-inflammatory properties of isolated HDL increased and in particular blood monocyte CD11b expression and neutrophil adhesion to a fibrinogen matrix was reduced. Interestingly, there was an enhancement of cholesterol efflux.

In case of coronary atherosclerotic disease, Tardif *et al.* have investigated the effects of rHDLs (CSL111®) on the plaque burden as assessed by intravascular ultrasound (IVUS) (156). In this randomized controlled trial, 183 patients were randomized to receive CSL111® (40mg/kg or 80mg/kg) or placebo. The higher-dosage CSL111® treatment group was

discontinued early because of liver function test abnormalities. Concerning the primary outcome of the study, there was no significant reduction in percentage change in atheroma volume or nominal change in plaque volume in CSL111® group compared with placebo.

In preclinical studies, the ability of HDLs to bind endotoxin has been well correlated with their phospholipid content (52). These results, motivated the development of a protein-free phospholipid emulsion containing phosphatidylcholine, soybean oil and sodium cholate in order to bind and eliminate LPS (157). In a phase I double blind crossover study, 10 male volunteers received either an infusion of placebo or an emulsion of 92.5% of phosphatidylcholine and 7.5% of triglyceride. All subjects completed the protocol without significant toxicity. Infusion of this emulsion was associated with a dose- and time- dependent upward trend in the total cholesterol due to an increase in LDL-C. HDLs decreased immediately after the infusion but rebounded to above placebo levels by the 24 h time point. In contrast, apoA-1 increased steadily during the course of infusion, indicating that there was less cholesterol molecules *per* HDL particle. Furthermore, another double-blind placebo-controlled study has enrolled 20 volunteers receiving *Escherichia coli* endotoxin infusion of either the same emulsion or placebo (158). A lower neutrophil count and TNF $\alpha$  and IL-6 levels were measured in patients who received the emulsion.

These encouraging results involving volunteers led to perform a randomized placebo-controlled phase II multicenter trial evaluating a phospholipid emulsion infusion in Gram-negative severe sepsis. However, the Lipid Infusion and Patient Outcomes in Sepsis (LIPOS) study failed to reduce 28-day all-cause mortality or the onset of new organ failure (10). There are several possibilities that might explain these disappointing results. First, the timing of administration (within 12 hours of fulfillment of the enrollment criteria) is probably too late as compared to the emulsion infusion timing in the animal studies (159,160). Second, there was no standardized protocol of care in this international study recruiting in 31 different

countries. Third, one important bias of the study is the heterogeneity of the recruited patients. Fourth, because patients treated with recombinant activated protein C were excluded, a lot of sepsis were excluded of the protocol and then the major etiology of this study was a large proportion of postoperative patient with intra-abdominal sepsis which could represent a potential bias. Lastly, in contrast to previous studies, logistic regression of LIPOS 28-day all-cause mortality rates showed no relationship with baseline cholesterol levels. Interestingly, HDLs and apoA-1 profiles were not assessed in the study.

To date, no randomized study using rHDLs or mimetic peptides in septic patients has been carried out. However, Pajkrt *et al.* have tested the effects of rHDLs in human endotoxemia (161): 8 healthy male volunteers were enrolled in a double blind crossover randomized placebo-controlled study. rHDLs given as a 4h-infusion at the dose of 40mg/kg dramatically reduced the endotoxin-induced inflammatory response: rHDLs infusion reduced the endotoxin-induced clinical symptoms (less chills, myalgia, backache or vomiting) and importantly reduced the release of TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-8 cytokines. Moreover, rHDLs infusion was associated with a downregulation of CD14, the main LPS receptor on monocytes. The same team also reported that rHDL infusion can affect the fibrinolytic activity and can directly influence platelet function by reducing platelet aggregation leading a modification of the procoagulant state associated with endotoxemia. Thus, the authors described that rHDL therapy allowed a decrease in plasma levels of prothrombin fragment F1+2 and of the Tissue Plasminogen Activator (162).

## Conclusion

To summarize, in addition to its well-documented role in reverse transport of cholesterol, HDLs display numerous pleiotropic effects such as LPS neutralization, endothelial protection, antioxidant and anti-apoptotic properties. Inflammation states and especially sepsis decrease dramatically HDL levels, alter their composition, metabolism and function. These findings strongly support the therapeutic potential of rHDL or HDL mimetic peptide infusion in sepsis. With an improvement of survival, experimental studies involving rHDLs or HDL mimetic peptides are encouraging. However, further experimental studies are needed to better characterize this new concept of HDL dysfunction of that is markedly associated with a poor outcome. A better comprehension of the function of these particles should encourage the medical and scientific community to initiate clinical trials aiming at testing the effect of a HDL therapy in human sepsis.

## Bibliography

1. Dellinger RP. Foreword. The Future of Sepsis Performance Improvement. *Crit Care Med.* 2015 Sep;43(9):1787–9.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016 Feb 23;315(8):801–10.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7):1303–10.
4. Kaukonen K-M, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA.* 2014 Apr 2;311(13):1308–16.
5. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013 Nov 21;369(21):2063.
6. Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis.* 2009 Oct;206(2):611–6.
7. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A: HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002, 161(1):1-16.
8. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, et al. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol.* 2013 Jun;169(3):493–511.



9. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 1994, 180(3):1025-1035.
10. Dellinger RP, Tomayko JF, Angus DC, Opal S, Cupo MA, McDermott S, et al. Efficacy and safety of a phospholipid emulsion (GR270773) in Gram-negative severe sepsis: results of a phase II multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-finding clinical trial. *Crit Care Med*. 2009 Nov;37(11):2929–38.
11. Dai L, Datta G, Zhang Z, Gupta H, Patel R, Honavar J, Modi S, Wyss JM, Palgunachari M, Anantharamaiah GM et al: The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J Lipid Res* 2010, 51(9):2695-2705.
12. Gupta H, Dai L, Datta G, Garber DW, Grenett H, Li Y, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by an apolipoprotein AI mimetic peptide. *Circ Res*. 2005 Aug 5;97(3):236–43.
13. Assmann G, Hight RJ, Sokoloski EA, Brewer HB. <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy of native and recombined lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Sep;71(9):3701–5.
14. Cockerill GW, Reed S. High-density lipoprotein: multipotent effects on cells of the vasculature. *Int Rev Cytol*. 1999;188:257–97.
15. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011 Oct;17(10):594–603.
16. Delalla OF, Elliott HA, Gofman JW. Ultracentrifugal studies of high density serum lipoproteins in clinically healthy adults. *Am J Physiol*. 1954 Nov;179(2):333–7.
17. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*. 1986;128:417–31.
18. Asztalos BF, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *Am J Cardiol*. 2003 Apr 3;91(7A):12E-17E.
19. Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am J Cardiol*. 2002 Jul 15;90(2):89–94.
20. Lund-Katz S, Liu L, Thuahnai ST, Phillips MC. High density lipoprotein structure. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2003 May 1;8:d1044-1054.
21. Phillips MC. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism. *J Lipid Res*. 2013 Aug;54(8):2034–48.
22. Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005 Feb;5(2):551–65.
23. Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005 Apr;5(5):1431–45.
24. Davidson WS, Silva RAGD, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jun;29(6):870–6.
25. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):746–56.
26. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011 Apr;13(4):423–33.

27. Miller NE, Thelle DS, Forde OH, Mjos OD. The Tromsø heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. *Lancet Lond Engl.* 1977 May 7;1(8019):965–8.
28. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977 May;62(5):707–14.
29. Rosenson RS, Brewer HB, Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2016 Jan;13(1):48–60.
30. Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20;275(42):33053–8.
31. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis.* 1999 Aug;145(2):227–38.
32. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972 Feb 25;46(4):1493–8.
33. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med Berl Ger.* 2006 Apr;84(4):276–94.
34. Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Feb 1;23(2):160–7.
35. Annema W, Tietge UJF. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep.* 2011 Jun;13(3):257–65.
36. Jiang X-C. Phospholipid transfer protein: its impact on lipoprotein homeostasis and atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2018;59(5):764–71.
37. Jahangiri A, Rader DJ, Marchadier D, Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye K-A. Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 2005 May;46(5):896–903.
38. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, et al. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):656–61.
39. Martinez LO, Jacquet S, Esteve J-P, Rolland C, Cabezón E, Champagne E, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature.* 2003 Jan 2;421(6918):75–9.
40. Brundert M, Heeren J, Merkel M, Carambia A, Herkel J, Groitl P, et al. Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J Lipid Res.* 2011 Apr;52(4):745–58.
41. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001;7(3):167–202.
42. Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest.* 1990 Sep;86(3):696–702.
43. Eggesbø JB, Lyberg T, Aspelin T, Hjermann I, Kierulf P. Different binding of 125I-LPS to plasma proteins from persons with high or low HDL. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996 Oct;56(6):533–43.
44. Roth RI, Levin FC, Levin J. Distribution of bacterial endotoxin in human and rabbit blood and effects of stroma-free hemoglobin. *Infect Immun.* 1993 Aug;61(8):3209–15.
45. Ulevitch RJ, Johnston AR. The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum. *J Clin Invest.* 1978 Dec;62(6):1313–24.

46. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest.* 1988 Jun;81(6):1925–37.
47. Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest.* 1979 Nov;64(5):1516–24.
48. Rall DP, Gaskins JR, Kelly MG. Reduction of febrile response to bacterial polysaccharide following incubation with serum. *Am J Physiol.* 1957 Mar;188(3):559–62.
49. Parker TS, Levine DM, Chang JC, Laxer J, Coffin CC, Rubin AL. Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect Immun.* 1995 Jan;63(1):253–8.
50. Levels JHM, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJH. Distribution and Kinetics of Lipoprotein-Bound Endotoxin. *Infect Immun.* 2001 May;69(5):2821–8.
51. Kitchens RL, Thompson PA, Munford RS, O’Keefe GE. Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid levels and enhance lipopolysaccharide binding to plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 2003 Dec;44(12):2339–48.
52. Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 15;90(24):12040–4.
53. Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, Reuter D, Pfeil D, Seilhamer JJ, et al. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics.* 1997 Dec 15;46(3):416–25.
54. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med.* 1986 Sep 1;164(3):777–93.
55. Vesey CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS: Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun* 2000, 68(5):2410-2417.
56. Lamping N, Dettmer R, Schröder NW, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R, et al. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest.* 1998 May 15;101(10):2065–71.
57. Van Lenten BJ, Fogelman AM, Haberland ME, Edwards PA. The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Apr;83(8):2704–8.
58. Brandenburg K, Jürgens G, Andrä J, Lindner B, Koch MHJ, Blume A, et al. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur J Biochem.* 2002 Dec;269(23):5972–81.
59. Morath S, von Aulock S, Hartung T. Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *J Endotoxin Res.* 2005;11(6):348–56.
60. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2003 Dec;67(4):686–723.
61. De Kimpe SJ, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 24;92(22):10359–63.
62. Levels JHM, Abraham PR, van Barneveld EP, Meijers JCM, van Deventer SJH. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound lipoteichoic acid. *Infect Immun.* 2003 Jun;71(6):3280–4.

63. Grunfeld C, Marshall M, Shigenaga JK, Moser AH, Tobias P, Feingold KR. Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipoteichoic acid. *J Lipid Res.* 1999 Feb;40(2):245–52.
64. Parent C, Eichacker PQ. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infect Dis Clin North Am.* 1999 Jun;13(2):427–47, x.
65. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S302-312.
66. Joyce DE, Nelson DR, Grinnell BW. Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: relevance of the protein C pathway. *Crit Care Med.* 2004 May;32(5 Suppl):S280-286.
67. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Nov;15(11):1987–94.
68. Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE, et al. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation.* 2001 Jan 2;103(1):108–12.
69. McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, Cuzzocrea S, Mota-Filipe H, Hinds CJ, Miller NE, Thiernemann C: Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock* 2003, 20(6):551-557.
70. Park S-H, Park JHY, Kang J-S, Kang Y-H. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Feb;35(2):168–82.
71. Suzuki M, Pritchard DK, Becker L, Hoofnagle AN, Tanimura N, Bammler TK, et al. High-density lipoprotein suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. *Circulation.* 2010 Nov 9;122(19):1919–27.
72. Mineo C, Shaul PW. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. *Circ Res.* 2012 Sep 28;111(8):1079–90.
73. De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt SV, Beyer M, et al. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol.* 2014 Feb;15(2):152–60.
74. Zhu S, Wang Y, Chen W, Li W, Wang A, Wong S, et al. High-Density Lipoprotein (HDL) Counter-Regulates Serum Amyloid A (SAA)-Induced sPLA2-IIe and sPLA2-V Expression in Macrophages. *PloS One.* 2016;11(11):e0167468.
75. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015 Oct;129(2):83–94.
76. Liadaki KN, Liu T, Xu S, Ishida BY, Duchateaux PN, Krieger JP, et al. Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem.* 2000 Jul 14;275(28):21262–71.
77. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Nègre-Salvayre A, de Souza JA, et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1843–9.
78. Mineo C, Shaul PW. Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc Med.* 2007 Jul;17(5):156–61.
79. Imachi H, Murao K, Cao W, Tada S, Taminato T, Wong NCW, et al. Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 May 1;23(5):898–904.

80. van der Stoep M, Korporaal SJA, Van Eck M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. *Cardiovasc Res.* 2014 Aug 1;103(3):362–71.
81. Viswambharan H, Ming X-F, Zhu S, Hubsch A, Lerch P, Vergères G, et al. Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2004 Apr 16;94(7):918–25.
82. Riwanto M, Landmesser U. High density lipoproteins and endothelial functions: mechanistic insights and alterations in cardiovascular disease. *J Lipid Res.* 2013 Dec;54(12):3227–43.
83. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med.* 2004 Dec 15;37(12):1986–94.
84. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol.* 2000 Aug;11(4):383–8.
85. Tward A, Xia Y-R, Wang X-P, Shi Y-S, Park C, Castellani LW, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002 Jul 23;106(4):484–90.
86. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998 Apr 15;101(8):1581–90.
87. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):2882–91.
88. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation.* 2000 May 30;101(21):2510–7.
89. Yan J-J, Jung J-S, Lee J-E, Lee J, Huh S-O, Kim H-S, et al. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med.* 2004 Feb;10(2):161–7.
90. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998 Jul 16;394(6690):284–7.
91. Christison JK, Rye KA, Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1995 Sep;36(9):2017–26.
92. Kopprasch S, Pietzsch J, Graessler J. The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL. *Mol Cell Biochem.* 2004 Mar;258(1–2):121–7.
93. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011 Jul;107(1):57–64.
94. Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):2158–66.
95. Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jun 16;272(3):872–6.
96. Muller C, Salvayre R, Nègre-Salvayre A, Vindis C. HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death Differ.* 2011 May;18(5):817–28.

97. de Souza JA, Vindis C, Nègre-Salvayre A, Rye K-A, Couturier M, Therond P, et al. Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med*. 2010 Mar;14(3):608–20.
98. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34480–5.
99. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, et al. Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia. *Crit Care Med*. 1996 Apr;24(4):584–9.
100. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, et al. Relationship of hypolipidemia to cytokine concentrations and outcomes in critically ill surgical patients. *Crit Care Med*. 2001 Aug;29(8):1563–8.
101. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP: Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Critical care medicine* 2003, 31(5):1359-1366.
102. Barlage S, Gnewuch C, Liebisch G, Wolf Z, Audebert FX, Gluck T, Frohlich D, Kramer BK, Rothe G, Schmitz G: Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med* 2009, 35(11):1877-1885.
103. Shor R, Wainstein J, Oz D, Boaz M, Matas Z, Fux A, et al. Low HDL levels and the risk of death, sepsis and malignancy. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc*. 2008 Apr;97(4):227–33.
104. Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, Yang PC: Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Critical care medicine* 2005, 33(8):1688-1693.
105. Cirstea M, Walley KR, Russell JA, Brunham LR, Genga KR, Boyd JH. Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an early prognostic marker for organ dysfunction and death in patients with suspected sepsis. *J Crit Care*. 2017 Apr;38:289–94.
106. Tanaka S, Labreuche J, Drumez E, Harrois A, Hamada S, Vigué B, et al. Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit. *Ann Intensive Care*. 2017 Dec;7(1):60.
107. Lee SH, Park MS, Park BH, Jung WJ, Lee IS, Kim SY, Kim EY, Jung JY, Kang YA, Kim YS et al: Prognostic Implications of Serum Lipid Metabolism over Time during Sepsis. *Biomed Res Int* 2015, 2015:789298.
108. Lekkou A, Mouzaki A, Siagris D, Ravani I, Gogos CA. Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis. *J Crit Care*. 2014 Oct;29(5):723–7.
109. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in infectious diseases and sepsis. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:483–508.
110. Trinder M, Genga KR, Kong HJ, Blauw LL, Lo C, Li X, et al. Cholesteryl Ester Transfer Protein Influences High-Density Lipoprotein Levels and Survival in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Oct 15;
111. Vermont CL, den Brinker M, Kâkeci N, de Kleijn ED, de Rijke YB, Joosten KFM, et al. Serum lipids and disease severity in children with severe meningococcal sepsis. *Crit Care Med*. 2005 Jul;33(7):1610–5.
112. Tsai M-H, Peng Y-S, Chen Y-C, Lien J-M, Tian Y-C, Fang J-T, et al. Low serum concentration of apolipoprotein A-I is an indicator of poor prognosis in cirrhotic patients with severe sepsis. *J Hepatol*. 2009 May;50(5):906–15.
113. Roveran Genga K, Lo C, Cirstea M, Zhou G, Walley KR, Russell JA, et al. Two-year follow-up of patients with septic shock presenting with low HDL: the effect upon acute

- kidney injury, death and estimated glomerular filtration rate. *J Intern Med.* 2017 May;281(5):518–29.
114. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(1):R15.
115. Khovidhunkit W, Kim M-S, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004 Jul;45(7):1169–96.
116. Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis.* 2000 Jun;181 Suppl 3:S462–472.
117. Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkilä E, Taskinen MR. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism.* 1988 Sep;37(9):859–65.
118. de la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, Byrne M, Joshi MR, Nguyen V, et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis.* 2012 Jun;222(2):390–4.
119. van der Westhuyzen DR, de Beer FC, Webb NR. HDL cholesterol transport during inflammation. *Curr Opin Lipidol.* 2007 Apr;18(2):147–51.
120. Jahangiri A, de Beer MC, Noffsinger V, Tannock LR, Ramaiah C, Webb NR, et al. HDL remodeling during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Feb;29(2):261–7.
121. Hacquebard M, Ducart A, Schmartz D, Malaisse WJ, Carpentier YA. Changes in plasma LDL and HDL composition in patients undergoing cardiac surgery. *Lipids.* 2007 Dec;42(12):1143–53.
122. Novak F, Vavrova L, Kodydkova J, Novak F, Hynkova M, Zak A, et al. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin Exp Med.* 2010 Mar;10(1):21–5.
123. Kotosai M, Shimada S, Kanda M, Matsuda N, Sekido K, Shimizu Y, et al. Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids.* 2013 Jun;48(6):569–78.
124. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):2758–67.
125. Vaisar T, Tang C, Babenko I, Hutchins P, Wimberger J, Suffredini AF, et al. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res.* 2015 Aug;56(8):1519–30.
126. Sharma NK, Tashima AK, Brunialti MKC, Ferreira ER, Torquato RJS, Mortara RA, et al. Proteomic study revealed cellular assembly and lipid metabolism dysregulation in sepsis secondary to community-acquired pneumonia. *Sci Rep.* 2017 Nov 15;7(1):15606.
127. Sharma NK, Ferreira BL, Tashima AK, Brunialti MKC, Torquato RJS, Bafi A, et al. Lipid metabolism impairment in patients with sepsis secondary to hospital acquired pneumonia, a proteomic analysis. *Clin Proteomics.* 2019;16:29.
128. McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, et al. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation.* 2009 Mar 3;119(8):1135–45.
129. Malik P, Berisha SZ, Santore J, Agatista-Boyle C, Brubaker G, Smith JD. Zymosan-mediated inflammation impairs in vivo reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 2011 May;52(5):951–7.
130. Smoak KA, Aloor JJ, Madenspacher J, Merrick BA, Collins JB, Zhu X, et al. Myeloid differentiation primary response protein 88 couples reverse cholesterol transport to inflammation. *Cell Metab.* 2010 Jun 9;11(6):493–502.

131. Guirgis FW, Leeuwenburgh C, Grijalva V, Bowman J, Kalynych C, Moldawer L, et al. HDL Cholesterol Efflux is Impaired in Older Patients with Early Sepsis: A Subanalysis of a Prospective Pilot Study. *Shock* Augusta Ga. 2017 Oct 18;
132. Ortiz-Munoz G, Couret D, Lapergue B, Bruckert E, Meseguer E, Amarenco P, et al. Dysfunctional HDL in acute stroke. *Atherosclerosis*. 2016 Oct;253:75–80.
133. Guirgis FW, Dodani S, Moldawer L, Leeuwenburgh C, Bowman J, Kalynych C, et al. Exploring the Predictive Ability of Dysfunctional High-Density Lipoprotein for Adverse Outcomes in Emergency Department Patients with Sepsis: A Preliminary Investigation. *Shock* Augusta Ga. 2017 Nov;48(5):539–44.
134. Zimetti F, De Vuono S, Gomaschi M, Adorni MP, Favari E, Ronda N, et al. Plasma cholesterol homeostasis, HDL remodeling and function during the acute phase reaction. *J Lipid Res*. 2017 Oct;58(10):2051–60.
135. Tanaka S, Diallo D, Delbosc S, Genève C, Zappella N, Yong-Sang J, et al. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Ann Intensive Care*. 2019 Jun 13;9(1):68.
136. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Després J-P, Hovingh GK, Stroes ESG, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med*. 2009 Jan 20;150(2):84–93.
137. Mutharasan RK, Thaxton CS, Berry J, Daviglius ML, Yuan C, Sun J, et al. HDL efflux capacity, HDL particle size, and high-risk carotid atherosclerosis in a cohort of asymptomatic older adults: the Chicago Healthy Aging Study. *J Lipid Res*. 2017 Mar;58(3):600–6.
138. Ditah C, Otvos J, Nassar H, Shaham D, Sinnreich R, Kark JD. Small and medium sized HDL particles are protectively associated with coronary calcification in a cross-sectional population-based sample. *Atherosclerosis*. 2016 Aug;251:124–31.
139. Morin EE, Guo L, Schwendeman A, Li X-A. HDL in sepsis - risk factor and therapeutic approach. *Front Pharmacol*. 2015;6:244.
140. Dai L, Datta G, Zhang Z, Gupta H, Patel R, Honavar J, et al. The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J Lipid Res*. 2010 Sep;51(9):2695–705.
141. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1325–31.
142. Datta G, Garber DW, Chung BH, Chaddha M, Dashti N, Bradley WA, et al. Cationic domain 141-150 of apoE covalently linked to a class A amphipathic helix enhances atherogenic lipoprotein metabolism in vitro and in vivo. *J Lipid Res*. 2001 Jun;42(6):959–66.
143. Zhang Z, Datta G, Zhang Y, Miller AP, Mochon P, Chen Y-F, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide treatment inhibits inflammatory responses and improves survival in septic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Aug;297(2):H866-873.
144. Datta G, Gupta H, Zhang Z, Mayakonda P, Anantharamaiah GM, White CR. HDL Mimetic Peptide Administration Improves Left Ventricular Filling and Cardiac output in Lipopolysaccharide-Treated Rats. *J Clin Exp Cardiol*. 2011 Dec 22;2(172).
145. Moreira RS, Irigoyen M, Sanches TR, Volpini RA, Camara NOS, Malheiros DM, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F attenuates kidney injury, heart injury, and endothelial dysfunction in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Sep 1;307(5):R514-524.
146. Zhang X, Wang L, Chen B. Recombinant HDL (Milano) protects endotoxin-challenged rats from multiple organ injury and dysfunction. *Biol Chem*. 2015 Jan;396(1):53–60.



147. Lerch PG, Förtsch V, Hodler G, Bolli R. Production and characterization of a reconstituted high density lipoprotein for therapeutic applications. *Vox Sang.* 1996;71(3):155–64.
148. Kwon WY, Suh GJ, Kim KS, Kwak YH, Kim K. 4F, apolipoprotein AI mimetic peptide, attenuates acute lung injury and improves survival in endotoxemic rats. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012 Jun;72(6):1576–83.
149. Sharifov OF, Xu X, Gaggar A, Grizzle WE, Mishra VK, Honavar J, et al. Anti-inflammatory mechanisms of apolipoprotein A-I mimetic peptide in acute respiratory distress syndrome secondary to sepsis. *PloS One.* 2013;8(5):e64486.
150. Casas AT, Hubsch AP, Rogers BC, Doran JE. Reconstituted high-density lipoprotein reduces LPS-stimulated TNF alpha. *J Surg Res.* 1995 Nov;59(5):544–52.
151. Casas AT, Hubsch AP, Doran JE. Effects of reconstituted high-density lipoprotein in persistent gram-negative bacteremia. *Am Surg.* 1996 May;62(5):350–5.
152. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol.* 2011 Apr;8(4):222–32.
153. Gupta H, Dai L, Datta G, Garber DW, Grenett H, Li Y, Mishra V, Palgunachari MN, Handattu S, Gianturco SH et al: Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by an apolipoprotein AI mimetic peptide. *Circ Res* 2005, 97(3):236-243.
154. Casas AT, Hubsch AP, Doran JE. Effects of reconstituted high-density lipoprotein in persistent gram-negative bacteremia. *Am Surg.* 1996 May;62(5):350–5.
155. Patel S, Drew BG, Nakhla S, Duffy SJ, Murphy AJ, Barter PJ, et al. Reconstituted high-density lipoprotein increases plasma high-density lipoprotein anti-inflammatory properties and cholesterol efflux capacity in patients with type 2 diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Mar 17;53(11):962–71.
156. Tardif J-C, Grégoire J, L’Allier PL, Ibrahim R, Lespérance J, Heinson TM, et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007 Apr 18;297(15):1675–82.
157. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Hudgins LC, Sloan B-J, et al. Safety and pharmacokinetics of an endotoxin-binding phospholipid emulsion. *Ann Pharmacother.* 2003 Aug;37(7–8):943–50.
158. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Feuerbach F, Saal SD, Sloan B-J, et al. Neutralization of endotoxin by a phospholipid emulsion in healthy volunteers. *J Infect Dis.* 2005 May 1;191(9):1515–22.
159. Winchell WW, Hardy J, Levine DM, Parker TS, Gordon BR, Saal SD. Effect of administration of a phospholipid emulsion on the initial response of horses administered endotoxin. *Am J Vet Res.* 2002 Oct;63(10):1370–8.
160. Goldfarb RD, Parker TS, Levine DM, Glock D, Akhter I, Alkhudari A, et al. Protein-free phospholipid emulsion treatment improved cardiopulmonary function and survival in porcine sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Feb;284(2):R550-557.
161. Pajkrt D, Doran JE, Koster F, Lerch PG, Arnet B, van der Poll T, et al. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med.* 1996 Nov 1;184(5):1601–8.
162. Pajkrt D, Lerch PG, van der Poll T, Levi M, Illi M, Doran JE, et al. Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thromb Haemost.* 1997 Feb;77(2):303–7.



**Contexte** : la principale fonction des HDL est le transport inverse du cholestérol des tissus vers le foie leur conférant ainsi un rôle de protection cardio-vasculaire. Ces particules présentent également d'autres propriétés endothélioprotectrices avec en particulier des effets anti-inflammatoires, antioxydants, anti-apoptotiques, anti-infectieux ou encore anti-thrombotiques.

Au cours de certains états d'inflammation chronique, comme dans l'athérosclérose, il a été décrit des modifications de fonction et de structure des HDL pouvant ainsi entraîner des conséquences néfastes sur la morbi-mortalité.

L'objectif de cette thèse a été de s'intéresser aux modifications structurales et de concentration survenant dans un modèle d'inflammation aiguë exacerbée, le sepsis chez l'homme. De plus, nous avons testé les effets de l'injection d'HDL reconstituées humaines dans plusieurs modèles de sepsis expérimentaux.

**Résultats** : dans une première partie, en comparant deux états inflammatoires exacerbés, nous avons montré que la concentration plasmatique de HDL était effondrée chez des patients à la phase aiguë d'un sepsis alors qu'elle n'était pas modifiée chez des patients polytraumatisés.

Une seconde partie s'est attachée à comparer des patients en choc septique et des patients non-septiques de réanimation. Nous avons confirmé ces différences observées de concentration. De plus, les patients septiques avaient une majorité de particules de HDL de grande taille comparativement aux patients contrôles qui avaient davantage de particules fonctionnelles de petite taille.

Une étude de la cinétique de la concentration des HDL chez 205 patients septiques de réanimation a mis en évidence une diminution drastique à la phase aiguë puis une augmentation lors de la guérison clinique du patient sans retour aux concentrations basales observées avant l'hospitalisation. La concentration de HDL était associée à certains critères de morbidité (score SOFA, jours vivants sans ventilation mécanique), mais aucun lien avec la mortalité n'a été retrouvé dans ce travail.

Une analyse protéomique de plasma de patients septiques a retrouvé une diminution drastique de nombreuses apolipoprotéines en comparaison avec le plasma de patients non-septiques.

Enfin, l'injection de HDL humaines reconstituées dans trois modèles murins de sepsis a mis en évidence une diminution de la mortalité, une diminution de nombreux marqueurs de l'inflammation et des concentrations bactériennes au niveau plasmatique et tissulaire.

**Conclusion** : au cours du sepsis, il existe à la fois des modifications quantitatives des HDL avec une diminution importante de leur concentration, mais aussi des modifications qualitatives avec en particulier une augmentation de la taille et des changements de composition de ces particules. La seule composante quantitative ne semble pas suffisante pour prédire le devenir des patients ; la dysfonction des HDL au niveau particulaire pourrait jouer un rôle important. L'injection d'HDL fonctionnelles a montré son efficacité dans plusieurs modèles murins. D'autres études pour caractériser ces dysfonctions sont nécessaires avant de mener à bien un essai randomisé évaluant l'injection thérapeutique de HDL au cours du sepsis chez l'homme.

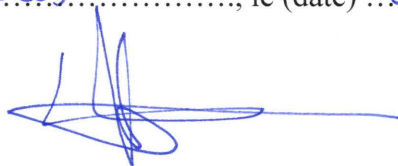
**Mots clés** : HDL (dysfonction, taille), inflammation, sepsis, protéomique, injection thérapeutique.

## LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

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

Fait à ..... Paris ....., le (date) ... 30-10-2019 .....

Signature :



### Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion (validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

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

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

En conséquence, chaque utilisateur doit :

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

#### La contrefaçon et le faux

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

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

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

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

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

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